جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

مقايسة كيميائية حيوية للواسم الالتهابي YKL-40 عند مرضى السكري نمط2

Biochemical assay of inflammatory marker YKL-40 in patients with type 2 diabetes mellitus

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في الكيمياء الحيوية السريرية

إعداد الصيدلاني

عبد القادر المالكي

إشراف الأستاذة الدكتورة

سحر الشماع

كلية الصيدلة – جامعة دمشق

1434 هـ - 2013 م

المحتويات Contents

List of Tables قائمة الجداول

List of Figures قائمة الأشكال

List of Abbreviation قائمة الإختصارات

YKL-40	(Tyr, Lys, Leu)-40 KD
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
HOMA	Homeostatic model assessment
WHO	World Health Organization
ADA	American Diabetes Organization
ROS	Reactive Oxygen Species
AGEs	Advanced Glycation End products
AR	Aldose reductase
SDH	Sorbitol Dehydrogenase
RAGE	Receptor of advanced Glycation End Products
DAG	DiAcyl Glycerol
PKC	Protein Kinase C
NO	Nitric Oxide
TGFβ	Transforming Growth Factor β
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
LDL-C	Low density Lipoprotein Cholisterol
HDL-C	High density Lipoprotein Cholisterol
TG	Triglyceride
TC	Total Cholesterol
Il-6	Interleukine-6
hsCRP	High sensitive C Reactive Protein
VCAM	vascular cell adhesion molecule-1
CHI3L1	Chitnase 3-like protein1
GLNAc	N-acetyl-D-glucosamin
VSMC	vascular smooth muscle cells
ECM	Extra cellular Matrix

FGF	fibroblast growth
BMI	Body mass Index
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
CAD	coronary arterial disease
CSF	Cerebro-spinal fluid
EDTA	Ethelyndiethylamine
ELISA	Enzyme Linked Immunoassay
STD	Standard
GDM	Gestational Diabetes Mellitus
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
FBG	Fasting Blasma Glucose
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
ATP	Adenosine triphosphate
DM	Diabetes Militus

List of Terminologies قائمة المصطلحات

English	عربي
Abnormalities	شذوذات
Action	تأثير
Activator	مفعل
Adipocyte	خلية شحمية
Advanced glycation end products	المنتجات النهائية للغلكزة المتقدمة
Atherosclerosis	التصلب العصيدي
Autoantibodies	أضداد ذاتية
Autoimmune	مناعي ذاتي
Binding	رابط
Biomarker	واسم حيوي
Cardiovascular	قلبي وعائي
Central	مركزي
Channel	قناة
Cholesterol	كولسترول
Chronic	مزمن
Circulating	جوال
Calssification	تصنيف
Criteria	معايير
Decarboxylase	نازعة الكربوكسيل

Defect	عيب
Deficiency	عوز
Dephosphrylation	نزع الفسفرة
Destruction	تخرب
Diabetes	السكري
Diabetic complications	مضاعفات السكري
Diagnosis	تشخيص
Disorder	اضطراب
Dysmetabolic	الخلل الاستقلابي
effect	أثر
Elimination	إطراح
Endothelial cell	الخلايا البطانية
Expression	تعبير
Extra cellular matrix	المطرس خارج الخلوي
Factor	عامل
Fasting	صيام
Fat	دهن
Fluid	سائل
Function	وظيفة
Gestational diabetes mellitus	الداء السكري الحملي
Glutamic acid	حمض الغلوتاميك
Glucose uptake	قبط الغلوكوز
Glycosylated hemoglobin	الهيموغلوبين
Glycogenesis	تكون السكر أو الغليكوجين

Glycolysis	تحلل الغلوكوز
High density lipoprotein	البروتين الشحمي المرتفع الكثافة
Hormone	هرمون
Hyperglycemia	فرط غلوكوز الدم
Hyperinsulinemia	فرط الانسولينية
hyperpresion	ارتفاع ضغط الدم
Idiopathic	مجهول السبب
Impaired	خلل
Nephropathy	الاعتلال الكلوي
Neuropathy	الاعتلال العصبي
Expression	تعبير
Index	منسب
Inflammatory	التهابي
Inhibitor	مثبط
Ketoacidosis	الحماض الكيتوني
Kinase	كيناز
Latent	خافي
lipase	ليباز
Lipid	شحم
Lipolysis	تحلل الشحوم
Low density lipoprotein	البروتين الشحمي منخفض الكثافة
Macrovascular disease	اعتلالات الأوعية الدموية الدقيقة
Marker	واسم
Matrix	مطرس

Maturity	نضج
Mechanism	آلية
Metabolism	استقلاب
Metabolism syndrome	المتلازمة الاستقلابية
Microvascular disease	اعتلالات الأوعية الدموية الدقيقة
Nausea	غثيان
Nephropathy	اعتلال الكلية
Neuropathy	اعتلال الأعصاب
Obesity	السمنة
Oral	فموي
Overweight	زيادة الوزن
Oxidative stress	الشدة التأكسدية
Pancreatic	بنكرياسي
Pathway	طريق
Phosphorylation	الفسفرة
Plasma	بلازما
Polydipsia	العطاش
Polyuria	بوال
Product	منتج
Production	إنتاج
Proinsulin	طليعة الأنسولين
Protein	بروتين
Receptor	مستقبل
Resistance	مقاومة

Serum	مصل
signal	إشارة
Site	موقع
Specific	نوعي
State	حالة
Structure	بنية
Substrate	ركازة
Symptoms	أعراض
Syndrome	متلازمة
Test	اختبار
Tissue	نسيج
Tolerance	تحمل
Triglyceride	ثلاثيات الغليسيريد
Type	نمط
Urine	بول
retinopathy	الاعتلال البصري

I. الدراسة النظرية

1- الداء السكري Diabetes Mellitus

1-1- تعريف

الداء السكري مجموعة من الأمراض الاستقلابية تتميز بارتفاع غلوكوز الدم Hyperglycemia تنتج عن عجز الجسم عن إفراز كمية كافية من الأنسولين أو عن عدم استجابة الخلايا للأنسولين المنتج في الجسم أو كليهما [1-4].

1-2- الوبائيات والانتشار

ارتفع المعدل العالمي للإصابة بالداء السكري بشكل كبير خلال العقدين الأخيرين، حيث وصل العدد إلى 177 مليون بحلول عام 2000. ومن المتوقع أن يصل إلى أكثر من 360 مليون عام 2030. وعلى الرغم من تزايد كلا النمطين الأول والثاني إلا أن معدل تزايد النمط الثاني للداء السكري هو الأكبر بسبب زيادة معدلات السمنة ونقص مستوى النشاط البدني للأفراد وخصوصاً في البلدان المتقدمة[5،6].

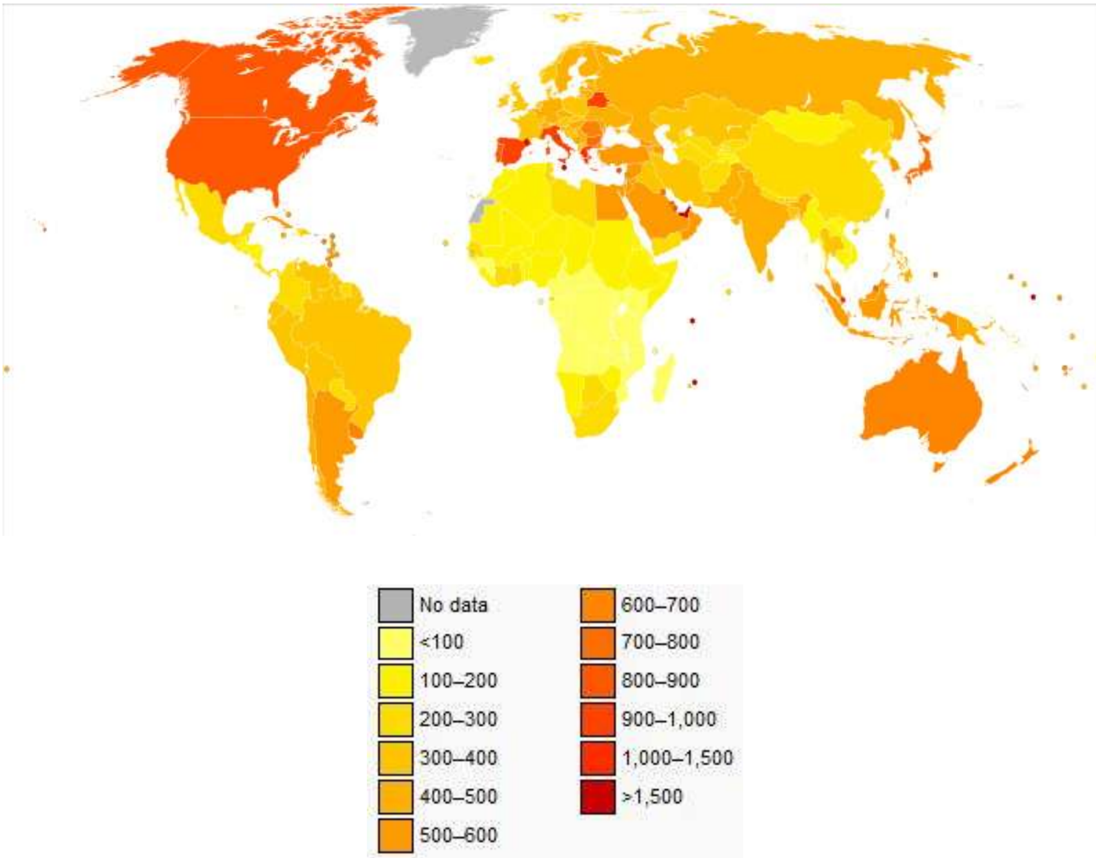
كما بينت مراكز الضبط والوقاية من المرض Centers for Disease Control and Prevention (CDC) في الولايات المتحدة الامريكية أن حوالي 25.8 مليون شخص أو ما يعادل 8.3% من التعداد السكاني مصابون بالداء السكري حتى عام 2010 [4]. ويرتبط انتشار الداء السكري بالعمر، حيث يوضح الجدول 1 تزايد نسب الإصابة بالداء السكري حول العالم مع تقدم العمر.

الجدول (1) علاقة العمر بانتشار الداء السكري [4].

المجموعة	العدد أو النسبة المصابة بالداء السكري
العمر ≥ 20 سنة	25.6 مليون أو 11.3%
العمر ≥ 65 سنة	10.9 مليون أو 26.9%

حيث يبين الجدول السابق تزايد نسبة الإصابة بالداء السكري من 11% لدى الأشخاص بعمر فوق 20 عاماً إلى 26.9% لدى الأشخاص بعمر فوق 65 عاماً.

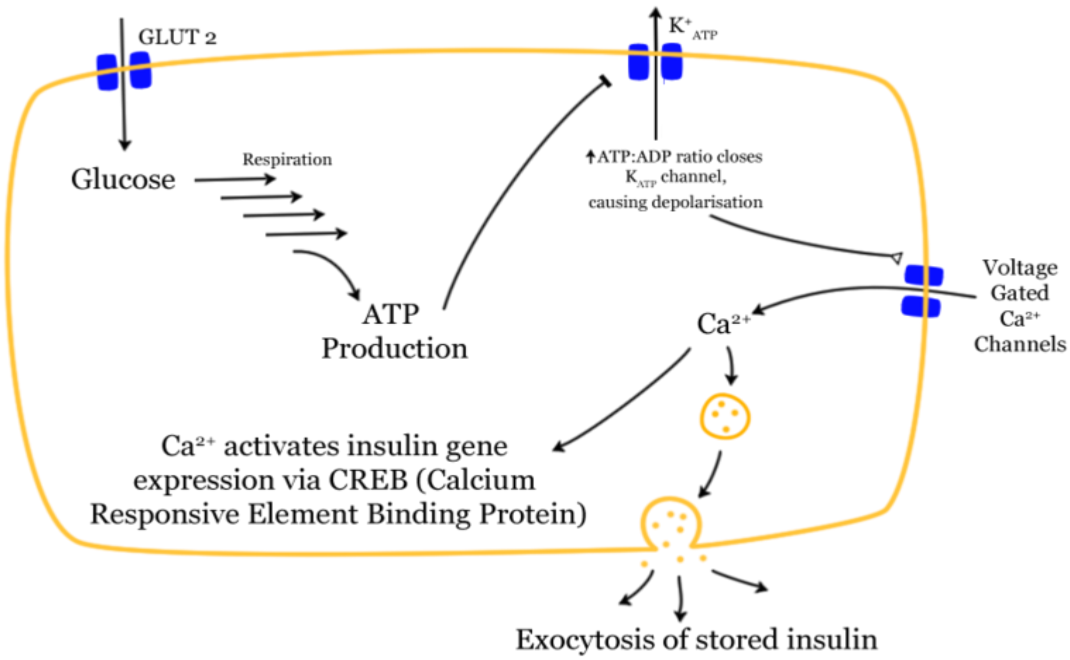
ويوضح الشكل(1) وبائيات انتشار السكري حول العالم [6].



الشكل (1) انتشار الداء السكري حول العالم في عام 2000[6].

1-3- الآلية الإمراضية

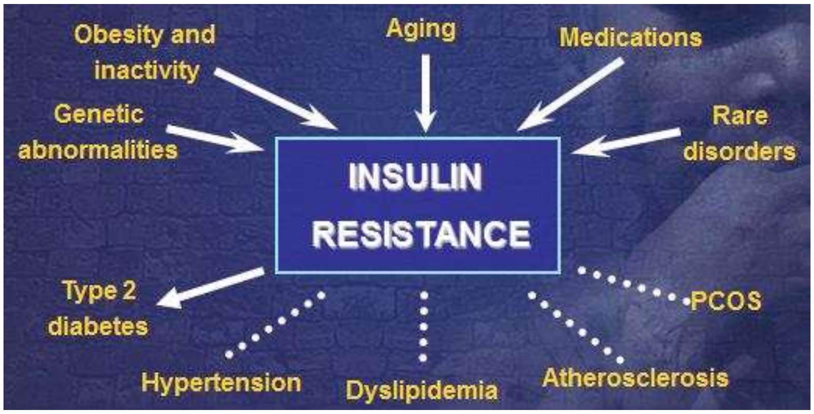
يعد الأنسولين هرموناً أساسياً يقوم بتنظيم قبط الغلوكوز من الدم إلى أغلب الخلايا (وخاصة الخلايا العضلية والخلايا الشحمية). لذا فعوز الأنسولين أو نقص حساسية مستقبلات الأنسولين أو عددها أو أن هذه المستقبلات لا تقوم بنقل الإشارة بشكل مناسب إلى المرسال الثاني يلعب دوراً أساسياً في إمراضية الأنواع المختلفة للداء السكري [7-10]. ويمثل الشكل 2 آلية مبسطة لتحرير الأنسولين من خلايا بيتا في البنكرياس[11].



الشكل (2): آلية تحرير الأنسولين في خلايا بيتا بنكرياسية طبيعية. إنتاج الأنسولين يتثبت بشكل أكبر أو أقل داخل خلايا بيتا. يتم تحفيز تحريره من قبل الطعام وخاصة الطعام الحاوي على غلوكوز قابل للامتصاص [11] .

حيث يلاحظ لدى مرضى الداء السكري ما يسمى بالمقاومة على الأنسولين والتي تعرف بأنها تناقص قدرة الخلايا الجسمية وخاصة الخلايا العضلية والشحمية على الاستجابة لتأثير الأنسولين في نقل الغلوكوز من الدوران العام إلى داخل هذه الخلايا. ولتعويض هذا النقص في الغلوكوز فإن البنكرياس يقوم بإنتاج كميات إضافية من الأنسولين، مما ينتج عنه زيادة مستويات الأنسولين بالتالي حدوث الـ hyperinsulinemia [3-1].

تزداد مقاومة الخلايا للأنسولين مع الزمن، فإذا كان البنكرياس قادراً على إنتاج كمية كافية من الأنسولين فإنه يتغلب على مقاومة الأنسولين ويحافظ على مستويات الغلوكوز ضمن الحدود الطبيعية، ولكن في حال فشله في إنتاج كميات كافية من الأنسولين فإن مستويات الغلوكوز تبدأ بالزيادة وبشكل خاص بعد الوجبة الطعامية. تؤدي هذه الحالة بمرور الزمن إلى زيادة مستويات الغلوكوز حتى في حالات الصيام وهذا ما يدعى بالداء السكري من النمط الثاني [3-1]. ويوضح الشكل 3 أهم مسببات ونتائج المقاومة للأنسولين.



الشكل (3): العوامل المؤهبة لحدوث المقاومة على الأنسولين وأهم نتائج المقاومة على الأنسولين [3]

ويمكن تعيين المقاومة على الأنسولين من خلال تحديد قيم منسب HOMA Homeostatic model assessment والذي يحسب من خلال المعادلة التالية:

$$HOMA-IR = \frac{Glucose(mg/dl) \times Insulin\ (\mu IU/ml)}{405}$$

حيث يقدر الأنسولين بـ µU/ml والغلوكوز بـ mg/dl.

4-1 التصنيف

وضعت رابط السكري الأمريكية الـ American Diabetes Association (ADA) في عام 2004 تصنيفاً للداء السكري تم اعتماده، حيث تم تقسيم الداء السكري إلى [12] :

- ❖ الداء السكري نمط 1 (Type1 Diabetes).
- ❖ الداء السكري نمط 2 (Type2 Diabetes).
- ❖ الداء السكري الحملي Gestational Diabetes Mellitus (GDM).
- ❖ الداء السكري الشبابي Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)
- ❖ الداء السكري المناعي المتأخر Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) [12]

وهناك مرحلة متوسطة يزداد فيها الغلوكوز الصيامي فوق الحدود الطبيعية ولكن ليس إلى مستوى الداء السكري وتسمى اضطراب الغلوكوز الصيامي impaired fasting glucose. ويوضح ذلك بالجدول 2 [13] .

الجدول (2): تصنيف الداء السكري (13).

التصنيف	الممرضات
النمط 1	○ تخرب خلايا بيتا ○ عدم إفراز الأنسولين ○ أضداد ذاتية: ❖ أضداد خلايا جزر لانغرهانس ❖ أضداد الأنسولين ❖ أضداد إنزيم غلوتاميك أسيد ديكربوكسيلاز ❖ أضداد إنزيم التيروزين فسفاتاز
النمط 2	❖ مقاومة للأنسولين مع خلل في إفراز الأنسولين ❖ نقص نسبي في إفراز الأنسولين
أنواع أخرى	يترافق مع حالات ثانوية: • خلل جيني في وظيفة خلايا بيتا • مرض في البنكرياس • مرض غدي • تحريض دوائي أو كيميائي • شذوذات في مستقبل الأنسولين • متلازمات جينية أخرى
الحملي	- تحمل الغلوكوز خلال الحمل - يعود إلى التغيرات الهرمونية والاستقلابية خلال الحمل.

مع وجوب الإشارة إلى أصناف أخرى من الداء السكري لم ترد في تصنيف WHO مثل[12]:

- ❖ السكري الذي يبدأ في سن الرشد Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY): وهو داء سكري من النمط الثاني إلا أنه يصيب الشباب.
- ❖ السكري المناعي الذاتي عند الكهول Latent Autoimmune (LADA) Diabetes in Adults: وهو داء سكري من النمط الأول يصيب الكهول، سببه وجود نشاط مناعي ذاتي ضد خلايا بيتا البنكرياسية.

❖ السكري الناجم عن الأخماج الفيروسية: الحصبة الألمانية، النكاف، فيروس كوكساكيβ.

❖ السكري المترافق مع المتلازمات الوراثية: متلازمة داون، تيرنر والتليف الكيسي[12].

ويوضح الجدول 3 الموجودات المخبرية في فرط غلوكوز الدم [14] .

الجدول(3) : الموجودات المخبرية في فرط غلوكوز الدم [14].

1- زيادة الغلوكوز في البلازما والبول
2- زيادة الجاذبية النوعية للبول
3- ارتفاع أسمولية المصل والبول
4- وجود المركبات الكيتونية في المصل والبول
5- انخفاض pH الدم والبول
6- اختلال توازن الالكتروليتات

1-4-1 الداء السكري نمط 1

وهو يحدث بآلية مناعية تتضمن تشكل أضداد ذاتية لخلايا جزر لانغرهانس وللأنسولين. ويتطور بشكل سريع ويعتمد على الأنسولين، وهناك ميل إلى الحماض Ketosis وله علاقة بالوراثة[14].

2-4-1 الداء السكري نمط 2 Type2 Diabetes

وهو يحصل نتيجة مقاومة الخلايا للأنسولين أو خلل في إفراز الأنسولين. يكون معظم المرضى في هذا النمط بدينين ولديهم نسبة زائدة من توزع دهون الجسم في منطقة البطن. يبقى هذا النمط غير مشخص عدة سنوات، وهو يترافق مع الاستعداد الوراثي والتقدم بالعمر والسمنة ونقص النشاط الفيزيائي. وتكون الأعراض أقل من أعراض النمط1 ونادراً ما يحدث الحماض الكيتوني، لكن يمكن أن يتعرض المرضى لسبات مفرط الأسمولية hyperosmolar coma وزيادة خطر ظهور الاختلاطات في الأوعية الدقيقة والكبيرة [17,16,15,2,1].

5-1 معايير التشخيص

بحسب نصائح منظمة الدواء الأمريكية فإنه يجب أن يجري قياس الغلوكوز الصيامي لدى الأشخاص بعمر أكبر من 45 عاماً كل ثلاثة أعوام إذا لم يشخص لديهم الداء السكري [18,12].

ويعد الهيموغلوبين السكري Hemoglobin A1c أحد المعايير المتخذة حديثاً للتشخيص، حيث أنه اختبار يعبر عن النسبة المئوية لجزيئات هيموغلوبين الدم المرتبطة إلى الغلوكوز، ويعكس هذا الاختبار مستويات الغلوكوز في الدم خلال الفترة السابقة للتحليل بـ 2-3 أشهر، وتكون النسبة الطبيعية أقل من 6.5%[18,12,3] .

وتقترح المعايير المدرجة في الجداول 4 و 5 و6 عدة طرق للتشخيص وهي:

الجدول (4): المعايير التشخيصية للداء السكري [18]

1- سكر البلازما العشوائي ≤ 200مغ/دل + أعراض الداء السكري
2- الغلوكوز الصيامي ≤ 126مغ/دل
3- تركيز الغلوكوز البلازمي خلال اختبار تحمل الغلوكوز الفموي ≤ 200 مغ/دل
4- الهيموغلوبين السكري A1c > 6.5%

الجدول (5) : تصنيف غلوكوز البلازما الصيامي.[19]

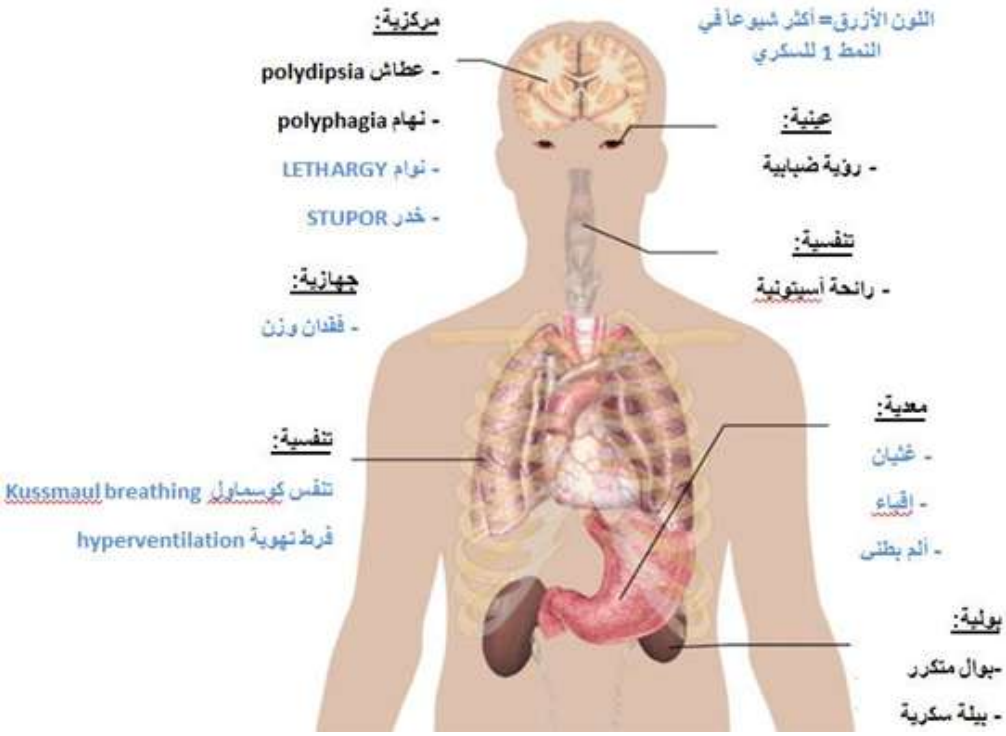
1- غلوكوز بلازمي طبيعي	FBG < 100mg/dl
2- غلوكوز بلازمي متخرب	100mg/dl ≤ FBG ≤ 126mg/dl
3- احتمال وجود إصابة بالداء السكري نمط2	FBG>126mg/dl

الجدول (6) : تصنيف تحمل الغلوكوز الفموي OGTT.[19]

1- تحمل غلوكوز فموي طبيعي	2-hour PG < 140 mg/dl
2- تحمل غلوكوز فموي متخرب	140mg/dl ≤ 2-hour PG < 200 mg/dl
3- احتمال وجود إصابة بالداء السكري نمط2	2-hour PG ≥ 200 mg/dl

6-1 الأعراض

يتميز مرض السكري بمجموعة كبيرة من العلامات والأعراض التي تصيب أجهزة البدن. ويلخص الشكل 4 أهمها [1].



الشكل(4): الأعراض الرئيسية للداء السكري والحماض الكيتوني [1]

1-7- المضاعفات

1-7-1- الاعتلالات الوعائية

تؤدي جميع أشكال مرض السكري إلى زيادة خطر حدوث المضاعفات طويلة الأمد، والتي تظهر عادةً بعد عدة أعوام (10- 20 عاماً). وتعد أذية الأوعية الدموية الاختلاط طويل الأمد الأساسي للداء السكري. حيث يؤدي الارتفاع المزمن لغلوكوز الدم إلى تلف الأوعية الدموية[21].

ويمكن تقسيم الاعتلالات الناتجة إلى نمطين:

أ- اعتلالات الأوعية الدموية الدقيقة Microvascular disease: وتتضمن:

- اعتلال الشبكية السكري :السبب الأساسي للعمى الذي يحصل ما بين عمر 20-74 عاماً[21].
- اعتلال الكلية السكري: يؤدي إلى حدوث الاعتلال الكلوي ووصوله إلى مراحله الأخيرة[21].

- اعتلال الأعصاب السكري: يصيب أكثر من 60-70% من مرضى السكري [22].

ب- اعتلالات الأوعية الكبيرة Macrovascular disease

وهي اعتلالات تصيب الأوعية الكبيرة التي تغذي : القلب، الدماغ، الاطراف السفلية[23].

2-7-1- الآليات الامراضية للأذيات الوعائية

تتداخل لدى مريض السكري عدد من الآليات الالتهابية والتي تقود لحدوث اعتلالات وعائية. ومن بين هذه الآليات:

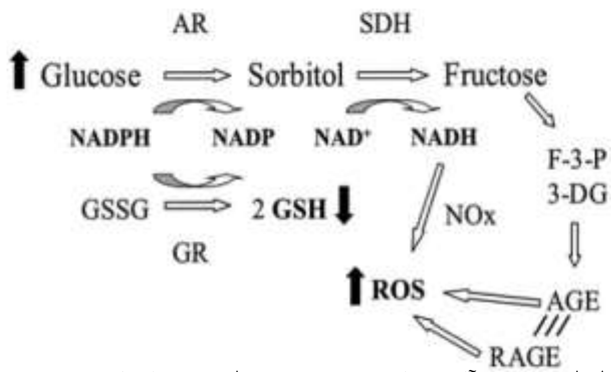
أ- زيادة تدفق سبيل الـ Polyol:

يعتبر سبيل البولي أول من الآليات المرضية التي تفسر بشكل خاص حدوث الاعتلال العصبي لدى مريض السكري نمط 2. يستنفد إنزيم الـaldose reductase، الذي يحول الغلوكوز إلى سوربيتول، التميم الإنزيمي NADPH الذي يستهلك أيضاً من قبل إنزيم glutathione reductas في عملية إعادة توليد الغلوتاتيون المرجعGSH. فعند حدوث فرط في غلوكوز الدم فإن 30% من الغلوكوز يتجه نحو سبيل الـPolyol. مؤدياً إلى استهلاك كميات كبيرة من الـ NADPH، وبالتالي انخفاض مستويات الغلوتاتيون المرجع GSH بشكل كبير مما يفاقم الشدة التأكسدية التي تلعب دوراً هاماً في إمراضية مضاعفات الداء السكري [23].

كما تؤدي أكسدة السوربيتول إلى فركتوز بواسطة أنزيم الـ sorbitol dehydrogenase (SDH) إلى حدوث الشدة التأكسدية، وذلك بسبب أن التميم الأنزيمي Nicotinamide (NAD) يتحول إلى Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) الذي يعد ركازة لإنزيم الـNADH Oxidase الإنزيم المسؤول عن توليد مركبات الـ ROS، وبالتالي فإن زيادة تميم الإنزيم الـNADH يؤدي لزيادة أنواع الأكسيجين التفاعلية (ROS) وبالتالي زيادة الشدة التأكسدية.

يحول سبيل الـPolyol في حال فرط غلوكوز الدم الغلوكوز إلى فركتوز. وبما أن الفركتوز ومستقلباته مثل 3-deoxyglucosone و fructose-3-phosphate هي مركبات تملك قدرة على إحداث غلكزة غير إنزيمية تفوق قدرة الغلوكوز، فإن هذا السبيل يزيد من تشكل النواتج النهائية للغلكزة المتقدمة Advanced Glycation End Products (AGEs)

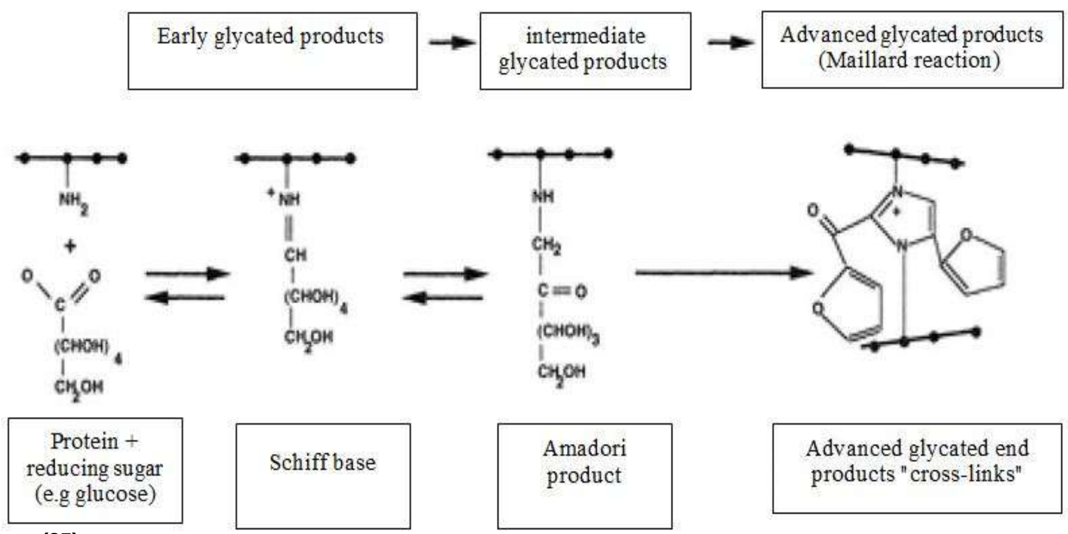
التي ترتبط مع مستقبلاتها وتؤدي لحدوث الشدة التأكسدية[23] ويبين الشكل(5) آليات حدوث الأذية الوعائية في سبيل البولي أول[23].



الشكل (5) رسم تخطيطي يبين الآليات التي يحدث بواسطتها سبيل الـ Polyol الأذية الوعائية[23] .

ب- <u>زيادة تشكيل المنتجات النهائية للغلكزة المتقدمة (AGEs):</u>

هي مجموعة مركبات تنتج عن تفاعل غير إنزيمي بين السكاكر المرجعة والمجموعة الأمينية للبروتينات ، يدعى هذا التفاعل بتفاعل ميلرد Maillard reaction. الشكل (6)[25]



الشكل :(6) رسم تخطيطي يبين مراحل تشكل المنتجات النهائية للغلكزة المتقدمة بتفاعل ميلر[25]

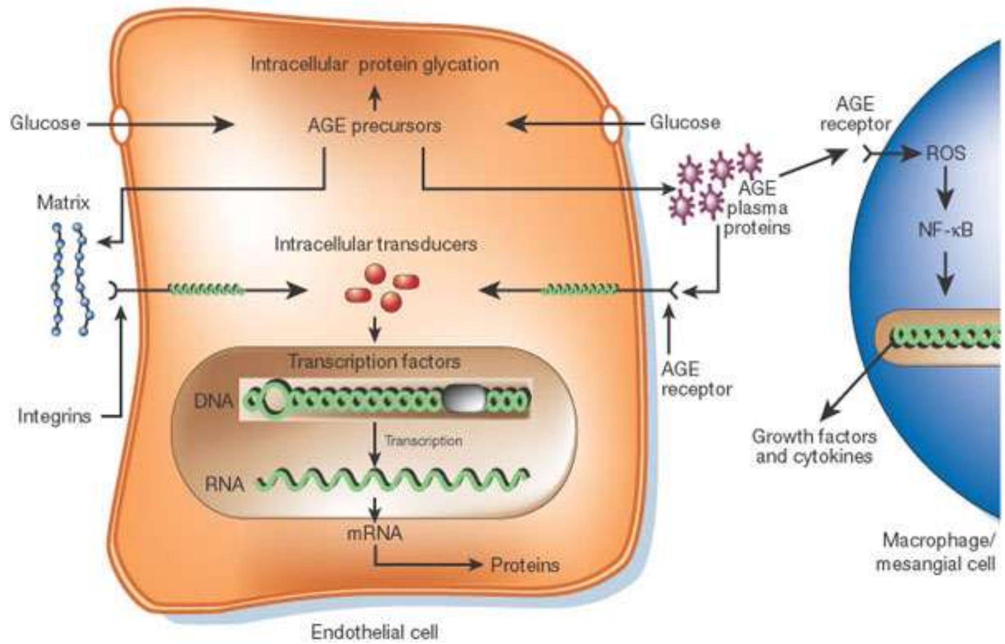
تتراكم مركبات الـAGEs بشكل طبيعي مع التقدم بالعمر، إلا أن هذه العملية تتسارع بشكل كبير عند مرضى الداء السكري بسبب ارتفاع غلوكوز الدم و الشدة التأكسدية. إن ارتباط مركبات الـAGEs مع مستقبلات خاصة بها تدعى بالـ Receptor for Advanced

Glycation Endproducts (RAGE) موجودة على سطح الخلايا الالتهابية (مثل البلاعم والخلايا التائية) والخلايا البطانية وخلايا العضلات الملساء الوعائية يؤدي إلى:

- تحرر السيتوكينات الإلتهابية و عوامل النمو من البلاعم.
- توليد جذور أوكسجين تفاعلية (ROS) في خلايا البطانة الوعائية.
- زيادة فعالية طلائع التخثر في الخلايا البطانية والبلاعم.
- تحريض تكاثر خلايا العضلات الملساء الوعائية واصطناع مكونات المطرس الخلوي[26].

تقوم مركبات الـAGEs بتدمير خلايا الجسم بثلاث آليات:

- الآلية الأولى: يتم فيها ارتباط مركبات الـAGEs مع بروتينات داخل خلوية في مقدمتها البروتينات المنظمة للانتساخ الجيني Proteins regulating gene transcription مما يؤدي إلى خلل في وظيفتها.
- الآلية الثانية: يتم فيها انتشار مركبات الـAGEs إلى خارج الخلية حيث تقوم بتعديل الجزيئات المطرسية خارج الخلوية (extracellular matrix molecules) مما يؤدي إلى تعديل الإشارة بين المطرس (matrix) والخلية وهذا يسبب خلل وظيفي خلوي.
- الآلية الثالثة: يتم فيها انتشار مركبات الـAGEs في الدوران العام حيث تقوم بتعديل البروتينات الجائلة في الدم مثل الألبومين، فيما بعد ترتبط هذه البروتينات الجائلة المعدلة بمستقبلات الـ AGEs الموجودة على أهداف خلوية أساسية مثل البلاعم والخلايا المساريقية الكبيبية وخلايا البطانة الوعائية وتفعلها، مما يؤدي إلى إنتاج السيتوكينات الالتهابية مثل IL-1 وعوامل النمو التي تسبب الإمراضية الوعائية (الشكل7)[27] .



الشكل (7) رسم تخطيطي يبين دور مركبات الـAGEs في إحداث الأذية الوعائية[26]

ت- <u>تفعيل سبيل البروتين كيناز PKC) C):</u>

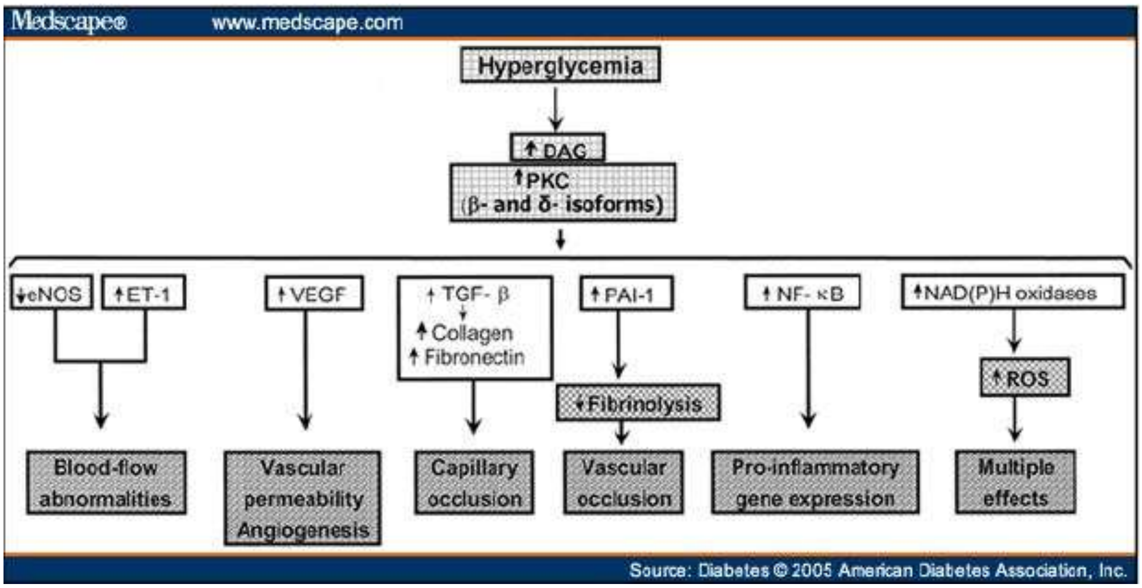
البروتين كيناز PKC) C) هي عائلة تتألف من 11 نظيراً إنزيمياً، يتفعل 9 منها عن طريق المرسال الثانوي دي أسيل الغليسرول DAG Diacyle Glycerol، الذي يرتفع عند ارتفاع مستوى الغلوكوز داخل الخلايا عن طريق زيادة اصطناع glyceraldehydes- 3- phosphate الناتج من تحلل السكر، والذي يتم إرجاعه إلى glycerol-3-phosphate، ومن ثم يتم أستلته[24].

تتلخص نتائج تفعيل البروتين كينازC(PKC) المحدث بفرط الغلوكوز في الدم بما يلي:

- شذوذات في تدفق الدم: ناتجة عن تثبيط انتاج أكسيد النتريكNO الموسع للأوعية الدموية، وزيادة فعالية Endothelin-1 المقبض للأوعية الدموية في الخلايا البطانية.
- زيادة النفوذية الوعائية: من خلال زيادة التعبيرعن Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) في الخلايا العضلية الملساء [27].
- الانسداد الوعائي: يزداد التراكم الشاذ لبروتينات المطرس على جدار الأوعية الدقيقة نتيجة

زيادة التعبير عن transforming growth factor -1 (TGFβ) والفيبرونكتين، وفرط التعبير عن Plasminogen activator inhibitor -2 (PAI-1) مما يساهم في تثبيط الفعالية الحالة للفبرين fibrinolysis.

- تفعيل إنزيمات oxidase المعتمدة على NADH: مما يؤدي لزيادة مستويات الـROS.
- زيادة مستويات Nuclear Factor-kb (NF-Kb): مما يؤثر في التعبير عن الجينات الالتهابية(27). ويبين الشكل 8 نتائج تفعيل البروتين كيناز C [26].

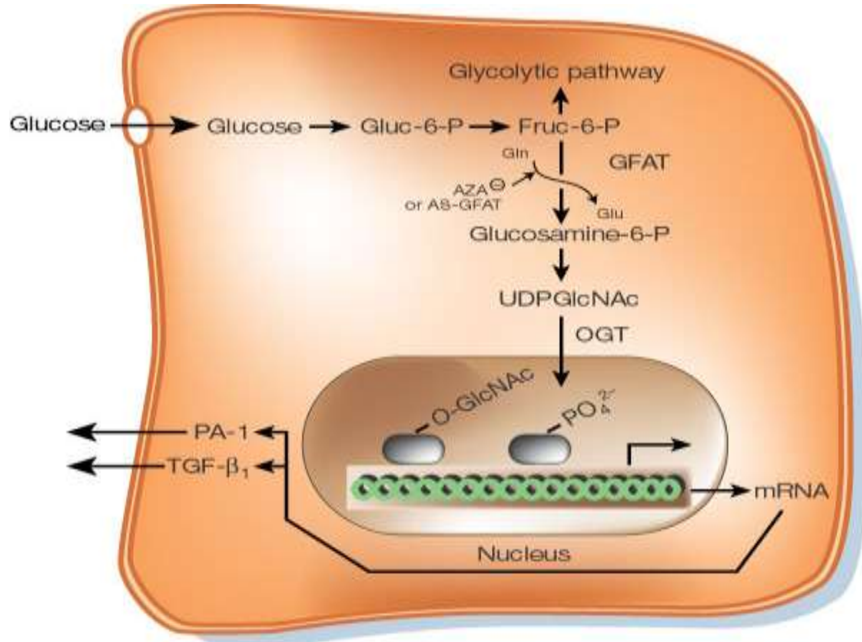


الشكل (8) رسم تخطيطي يبين نتائج تفعيل البروتين كيناز C (PKC) [26]

ث- <u>زيادة فعالية سبيل الهكسوزأمين (Hexoseamine pathway):</u>

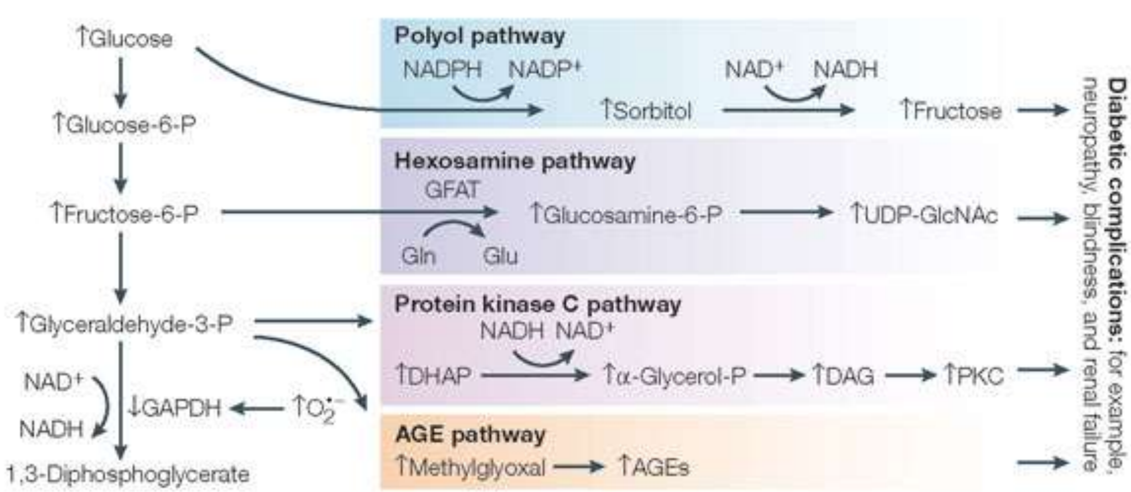
تتحول بعض مركبات الفركتوز -6 -فسفات المتشكلة نتيجة ارتفاع تركيز الغلوكوز في سبيل الهيكزوزأمين (Hexoseamine pathway) بتوسط إنزيم glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) إلى غلوكوز أمين 6 فسفات. وبعد جملة من التفاعلات نحصل على مركب الـ UDP(uridine diphosphate)N- acetyl glucosamine الذي يقوم بإضافة الـ N-acetyl glucosamine على ثمالة السيرين والثريونين إلى عوامل الانتساخ. يؤدي فرط تعديل بروتينات الإنتساخ بواسطة الغلوكوزأمين إلى تغيرات مرضية في التعبير الجيني. فمثلا يؤدي فرط تعديل بروتينات الانتساخ Specificity Protein 1 (SP1) إلى زيادة التعبير عن transforming growth

factor-β1 و plasminogen activator inhibitor-1 مما يؤدي إلى خلل في وظيفة الأوعية الدموية عند مرضى السكري (الشكل 9)[27].



الشكل(9) رسم تخطيطي يبين دور سبيل الهيكزوزأمين في إحداث الأذية الوعائية[27]

ويلخص الشكل 10 الآليات الأربعة المحدثة للأذيات الوعائية .



الشكل (10) الآليات الاربع المحدثة للأذية الوعائية لدى ارتفاع الغلوكوز

pyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

- المظاهرالفيزيولوجية المرضية المشتركة في اعتلال الأوعية الدقيقة

أ- ارتفاع الغلوكوز داخل الخلايا

تكون بعض الخلايا، وخاصة الخلايا البطانية، غير قادرة على التنظيم السلبي لنقل الغلوكوز عند تعرضها لمستويات مرتفعة من الغلوكوز خارج الخلية، حيث أنها لا تظهر أي تبدل في عدد ناقلات الغلوكوز المفعَّلة مما يؤدي إلى فرط في الغلوكوز داخل هذه الخلايا[24].

ب- حدوث شذوذ في وظائف الخلايا البطانية :

يؤدي فرط غلوكوز الدم إلى نقص في إنتاج أكسيد النتريك و زيادة الحساسية للأنجيوتنسين II مما ينتج عنه زيادة في تدفق الدم والضغط الوعائي الداخلي. كما يؤدي إلى زيادة فعالية البروتين كيناز PKC) C)، مما ينتج عنه زيادة في التعبير عن Vascular (VEGF) endothelial growth factor في خلايا العضلة الملساء، وبالتالي زيادة النفوذية الوعائية التي تصبح مع تقدم المرض غير عكوسة[24].

ت- زيادة تراكم البروتين على جدران الأوعية الدموية

يحصل ارتشاح شاذ لبروتينات البلازما السكرية، إذ تترسب على جدران الأوعية الشعرية وتحرض الخلايا المحيطة بالأوعية، مثل الخلايا البينية، على تحرير عوامل النمو مثل عامل النمو المحول Transforming growth factor β الذي يحرض مباشرةً الإنتاج المفرط للمكونات المطرسية خارج الخلوية ويحدث استماته في أنواع محددة من الخلايا التي تحدث فيها مضاعفات[24].

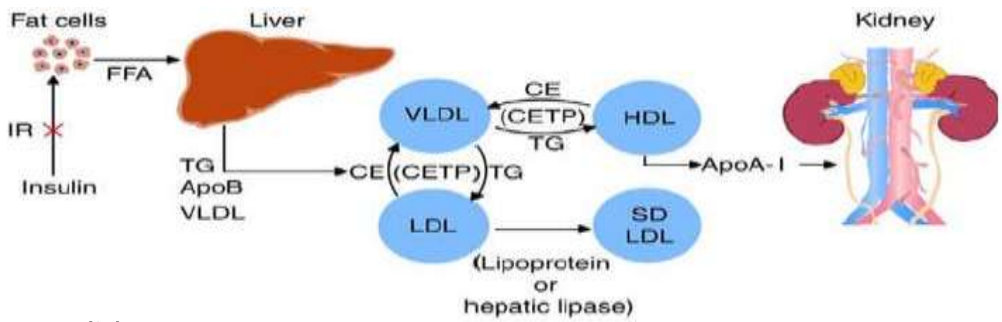
ث- خسارة خلايا الأوعية الدموية الدقيقة والانسداد الوعائي:

يؤدي الداء السكري إلى حدوث استماتة في الشبكية لخلايا مولر والخلايا العقدية، أما في الشبكة الوعائية العصبية فيحدث تنكس في الخلايا البطانية والخلايا البينية، مما يؤدي في النهاية إلى اعتلال الأعصاب[24].

- المظاهر الفيزيولوجية المشتركة لاعتلال الأوعية الكبيرة:

يزيد الداء السكري من خطورة الأمراض القلبية الوعائية بنسبة 75-90%. تؤدي المقاومة للأنسولين على مستوى الخلايا الشحمية إلى زيادة حلمهة ثلاثي الغليسريد وتحرير الحموض

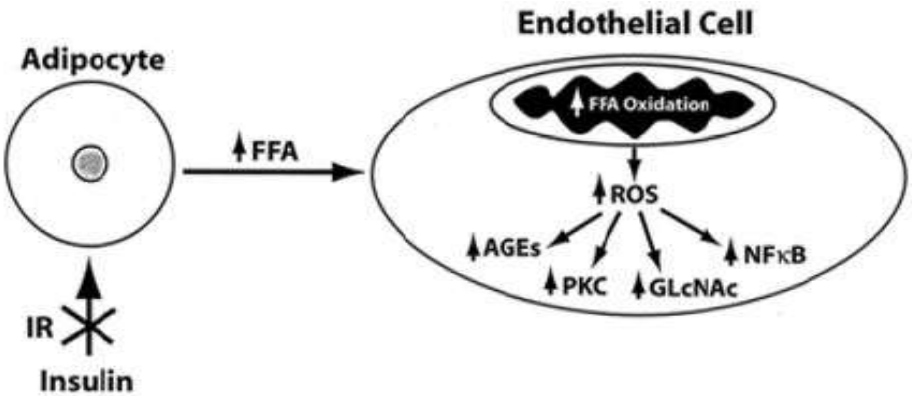
الدهنية الحرة من الخلايا الشحمية إلى الدوران العام ثم إلى الكبد وخلايا البطانة الوعائية. مما يؤدي إلى زيادة تشكل جزيئات الـLDL التي تعمل كركيزة لإنزيمات الـ Lipase لتحولها إلى شكل أصغر وأكثر كثافة (small, dense LDL particles) التي تملك قدرة أكبر على اختراق الجدار الوعائي إلى الفراغ تحت البطانة، حيث تتأكسد بمؤكسدات خلوية مختلفة مولدة جزيء الـ LDL المؤكسد، والذي يؤدي بالإضافة إلى انخفاض مستوى الـHDL إلى حدوث اعتلالات في الأوعية الدموية الكبيرة (الشكل 11)[24] .



الشكل (11): رسم تخطيطي يبين النمط الشحمي المميز في حال المقاومة للأنسولين[24]

كما يؤدي تدفق الحموض الدهنية الحرة إلى زيادة أكسدة الحموض الدهنية الحرة في المتقدرات، وتوليد زيادة من الجزيئات المانحة للالكترون مثل NADH و FADH2 عن طريق الأكسدة البائية (β-oxidation). وهذا يؤدي إلى زيادة إنتاج أنواع الأكسجين التفاعليةROS في المتقدرات وبالتالي زيادة أكسدة جزيئات الـLDL وتفعيل الآليات المحدثة للأذية الوعائية والتي تتضمن:

- ❖ زيادة تشكيل المنتجات الإنتهائية للغلكزة المتقدمة (AGEs).
- ❖ تفعيل كيناز البروتين C (PKC)
- ❖ تفعيل سبيل hexosamine (glcNAc)
- ❖ تفعيل NFκB (الشكل 12) [27] .



الشكل (12): رسم تخطيطي يبين تأثير المقاومة للأنسولين على الخلايا الشحمية(27)

- التصلب العصيدي والآلية الالتهابية لحدوثه

يعرف التصلب العصيدي بأنه مجموعة التبدلات في بطانة الشرايين الكبيرة والمتوسطة. وهو ينتج عن ترسبات موضعية دهنية وتراكم خلايا التهابية وخلايا العضلات الملساء والنسيج الرابط في طبقة البطانة. تتطور الإصابة على مدى العديد من السنوات، وتأخذ شكل تقرحات ونتوءات عصيدية دهنية وكلسية يزيدها تماسكاً نسيج ليفي صلب، الأمر الذي يجعل الشريان متضيقاً وفاقداً للمرونة[28].

يؤدي هذا الاضطراب إلى تحريض الخلايا البطانية على إفراز العديد من العوامل الالتهابية التي تلعب دوراً هاماً في حدوث هذه الأذية مثل :

- جزيئات الإلتصاق الخلوية Adhesion molecules .
- عامل النمو للأرومة الليفية Fibroblast Grouth Factor (FGF) .
- العامل النسيجي Tissue Factor (TF) .
- مفعل البلازمينوجين Plasminogen Activator (PA) .
- الإندوثيلين Endothelin [29].

يعد التصلب العصيدي من الأمراض الالتهابية المزمنة، وتلعب المناعة الخلوية دوراً رئيساً في ترقيه. حيث تشارك كل من الوحيدات Monocytes، البلاعم Macrophages، اللمفاويات التائية، خلايا العضلات الملساء، والوسائط الالتهابية في تطور اللويحة العصيدية[30].

بين العلماء أن المستويات المرتفعة من الغلوكوز تزيد وبشكل ملحوظ مستويات العديد من السيتوكينات ماقبل الالتهابية pro-inflammatory cytokines مثل الإنترلوكين12الذي ينتج من قبل البلاعم macrophages وهي خلايا مناعية تلعب دوراً رئيسياً في حدوث الالتهاب المزمن لدى مرضى السكري نمط2. أما السيتوكينات فهي مواد تفرز من الخلايا المناعية يمكنها أن تبرمج program أنواع محددة من الكريات البيضاء لتصبح خلايا تائية مساعدة T helper 1. حيث يعد تمايز الخلايا التائية وإفراز الـIL-12 سبيلين مهمين لزيادة الالتهاب الجهازي الذي يحصل في الداء السكري نمط2. حيث لوحظ تجريبياً وجود مستويات مرتفعة من IL-12 لدى مرضى كل من النمط الأول والنمط الثاني من السكري(31).

تنبه السيتوكينات الالتهابية المتورطة في الالتهاب الوعائي توليد جزيئات الالتصاق الخلوي وإنزيمات البروتياز وغيرها من الوسائط والتي تدخل الدوران العام بشكل ذواب. تحفز هذه السيتوكينات أيضاً إنتاج الإنترلوكين 6 (IL-6) وهو سيتوكين مرسال messenger cytokine يقوم بتحفيز الكبد ليقوم بزيادة إنتاج متفاعلات الطور الحاد acute-phase reactant مثل البروتين المتفاعل CRP) C). إضافةً لذلك، يمكن أن تولد الصفيحات والنسيج الشحمي وسائط التهابية وثيقة الصلة بالتصلب العصيدي(32).

هناك العديد من الدلائل التجريبية التي تقترح أن LDL المعدل بالأكسدة أو بالغلكزة يثير استجابة التهابية على جدران الشريان، مؤدياً إلى إطلاق العديد من العمليات الحيوية التي قد تقود لإحداث التصلب العصيدي. تبين أن الالتهاب في الخلايا المتورطة بإحداث التصلب العصيدي يتم إطلاقه من قبل عوامل خطورة أخرى، بما فيها التدخين والمقاومة على الأنسولين وارتفاع التوتر الشرياني. لذا فالسبل الالتهابية التي تدخل في الاستجابات المناعية الفطرية Innate والمتكيفة adaptive يبدو أنه تطلق العديد من عوامل الخطورة التقليدية والحديثة للتصلب العصيدي (32).

- ❖ الآلية الالتهابية والمناعية لتطور الآفة العصيدية

تتشكل بدايةً الأثلام الشحمية fatty streaks تحت الطبقة البطانية لجدران الأوعية لدى بعض الأشخاص. وهي تدعى بهذا الاسم لأنها مؤلفة من خلايا رغوية مليئة بالدهون. ومن الممكن أن

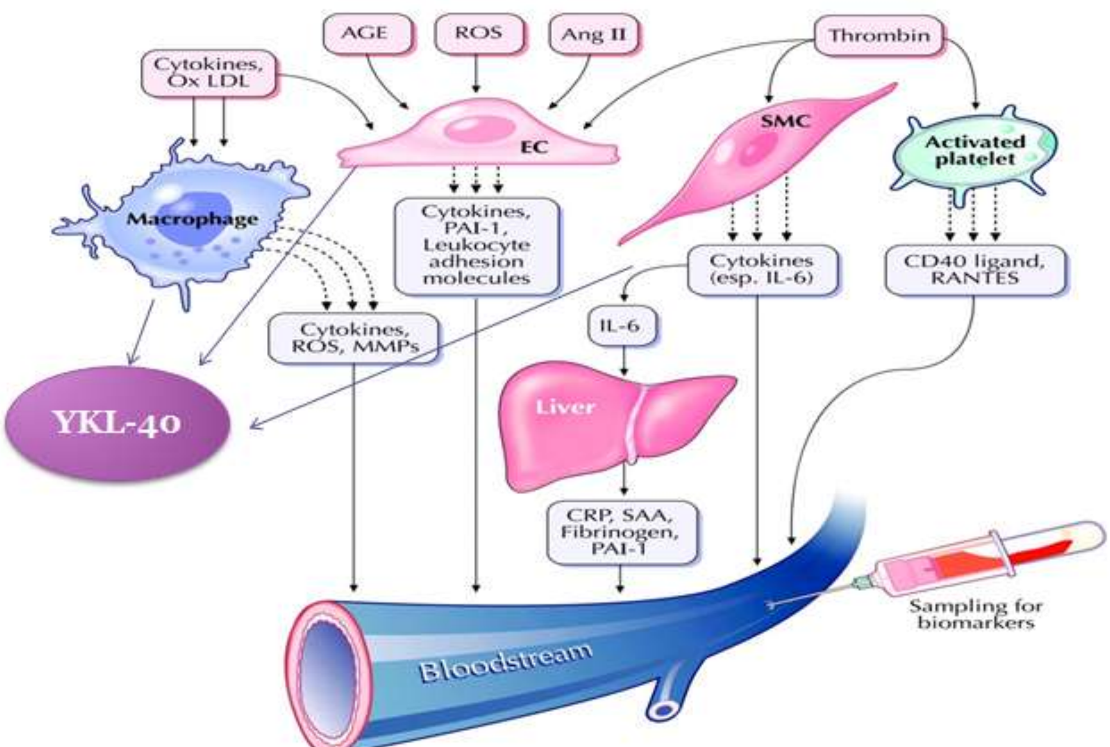
تتشكل بأعمار مبكرة (بسن 20 عاماً تقريباً)، ومن ثم قد تتطور إلى آفة lesion داخل جدار الشريان. تزداد هذه الأثلام بشكل بؤري ضمن البروتينات الشحمية في طبقة الـ Intima، حيث ترتبط هناك مع مكونات المطرس الخارج خلوي مثل البروتيوغليكان proteoglycans، مؤدية لإبطاء خروجها. هذا الاحتباس يعزل الليبوبروتينات داخل طبقة الـ Intima ويفصلها عن مضادات الأكسدة الموجودة في البلازما، مما يرجح تحولها التأكسدي(32).

تقاوم الخلايا البطانية عادةً التصاق الكريات البيضاء. تقوم المنبهات ما قبل الالتهابية بما فيها الحمية الغنية بالدهون المشبعة، فرط كوليستيرول الدم، والتدخين بإطلاق التعبير البطاني عن جزيئات الالتصاق مثل الـ P-selectin والـvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) والتي تتواسط ربط الوحيدات واللمفاويات الجائلة في الدم .وتتشكل الآفات العصيدية عادةً في مكان تشعب الشرايين، حيث يكون التدفق الدموي مضطرب، مما يقلل فعالية الجزيئات البطانية الواقية من التصلب مثل أكسيد النترات وتطلق التعبير عن VCAM-1 بشكل موضعي (33,32).

كما تقوم عوامل الجذب الكيميائي مثل البروتين الجاذب للوحيدات monocyte chemoattractant protein-1 المنتج من قبل خلايا الجدار الوعائي كاستجابة للبروتينات الشحمية المعدلة بتحفيز ارتحال وانسلال الوحيدات الملتصقة. تزيد الوحيدات الملتصقة مباشرة مع خلايا البطانية إنتاج إنزيم metalloproteinase 9 (MMP-9) من مطرس خلايا الوحيدات، مما يسمح لاحقاً بنفوذ الكريات البيضاء عبر الطبقة البطانية وغشائها. تتحول الوحيدات داخل طبقة الـIntima إلى بلاعم تحت تأثير العامل macrophage colony-stimulating factor والذي يزداد التعبير عنه في طبقة الـ Intima الملتهبة. كما أن تفعيل العامل السابق يزيد أيضاً من تعبير البلاعم عن scavenger receptors وهي أحد أفراد عائلة مستقبلاتpattern-recognition receptor superfamily والتي تبتلع engulf الليبوبروتينات المعدلة من خلال عملية الالتقام receptor-mediated endocytosis. إن تراكم إسترات الكوليستيرول في الهيولى يحول البلاعم إلى خلايا رغوية –وهي خلايا بلاعم محملة بالشحوم تميز المرحلة المبكرة من التصلب العصيدي. وبالمقابل تقوم البلاعم بزيادة الاستجابة المناعية من خلال إفراز عدد من عوامل النمو والسيتوكينات، بما فيها عامل النخر

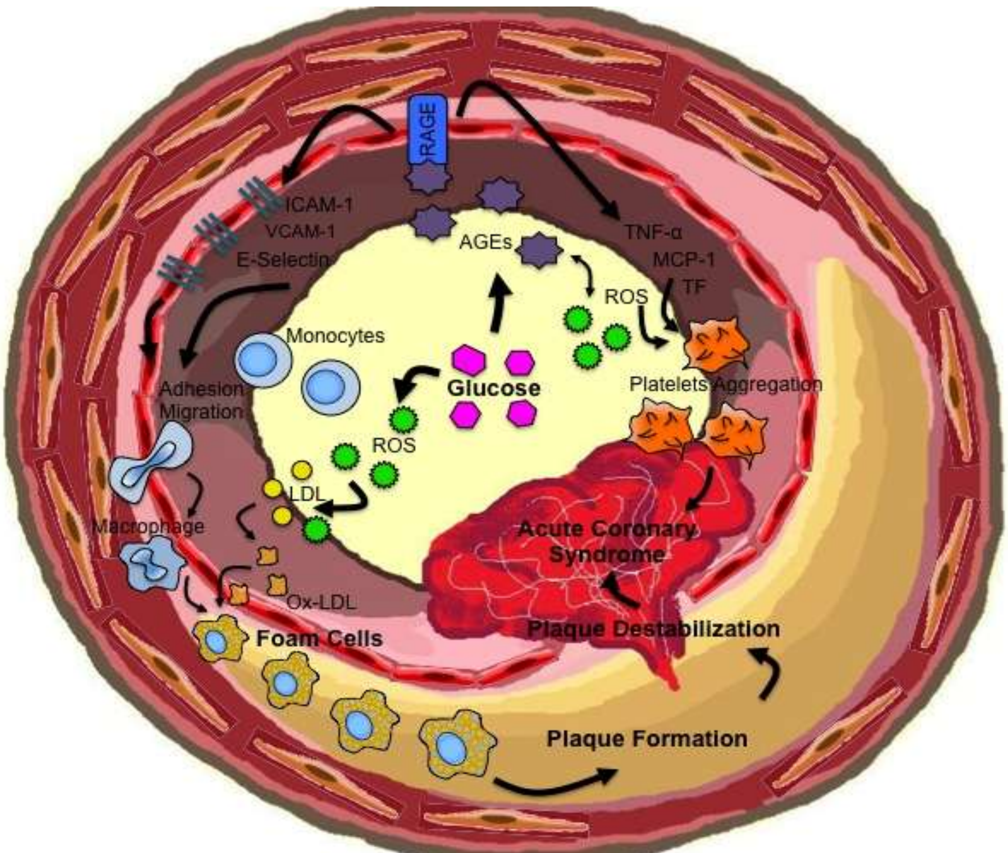
الورمي TNFα والإنترلوكين β1 (IL-1β) [33,32]. كما أن هذه البلاعم المفعلة تقوم بإنتاج السيتوكين الالتهابي YKL-40 الذي تبين أيضاً أنه يفرز من خلايا العضلات الملساء الوعائية خلال مراحل الالتهاب الوعائي كما سيرد لاحقاً [49].

تلعب الخلايا التائية أيضاً وخاصة CD4 دوراً رئيسياً في التعصد، حيث تقوم بتضخيم الفعالية الالتهابية الموضعية من خلال إنتاج سيتوكينات ماقبل التهابية مثل IFN-γ، مما يؤدي إلى استمرار وتطور اللويحة [33]. الشكل (13).



الشكل (13) الالتهاب وربط عوامل الخطورة التقليدية بتعديل أحداث خلوية ضمن الجدار الشرياني وبإفراز معالم التهابية ضمن الدوران العام[33].

***AGE*,advanced glycation end products; *Ang II*, angiotensin II; *OxLDL*, oxidized low-density lipoprotein; *RANTES*, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; *ROS*, reactive oxygen species; *SAA*, serum amyloid A.**



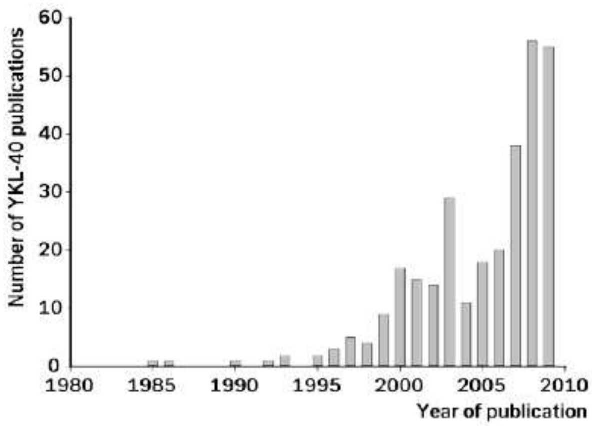
الشكل (14): تشكل اللويحة العصيدية، الآلية الإلتهابية[34].

2- واسمات جديدة في المضاعفات الوعائية للداء السكري New Markers of vascular complication of Diabetes Mellitus:

إن التقدم في فهم الآلية الإمراضية في الأذيات الوعائية لدى مرضى السكري نمط2 أثبت أن هذه الأذيات تتداخل فيها مجموعة من العوامل الالتهابية والوعائية والتي قد ترتبط زيادة تراكيزها البلازمية مع زيادة خطر الأذية الوعائية. لذا عمد الباحثون إلى دراسة وفهم هذه العوامل، مما قد يسمح بفهم أعمق لهذه الآليات الإمراضية وإمكانية الاستفادة منها للتنبؤ عن حدوث هذه الإصابات أو عن تطورها أو لقياس فعالية العلاج. الأمر الذي يؤدي في النهاية إلى تحسين الوضع الصحي لمريض السكري[35].

فمثلاً ترتفع مستويات CRP المصلي - وهو من متفاعلات الطور الحاد- عند مرضى السكري نمط2 بشكل يتناسب ايجابياً مع زيادة الأذيات الوعائية. وهو المعلم الالتهابي الذي ركزت عليه معظم الأبحاث المنشورة كمعلم خطورة مستقل للمرض القلبي الوعائي **[35]**.

ومن بين العوامل الالتهابية اهتم الباحثون حديثاً بدراسة البروتين الالتهابيYKL-40 كأحد العوامل المساعدة والمشاركة في الأذيات الوعائية لدى مرضى الداء السكري. ولقد ارتفع عدد الأبحاث التي أجريت حول هذا البروتين بشكل ملحوظ كما يوضح الشكل15[36].



الشكل (15) تزايد عدد الدراسات المنشورة التي تدرس YKL-40 [36].

YKL-40 -3

YKL-40 هو بروتين سكري رابط للهيبارين والكيتين ينتمي إلى عائلة الغليكوزيد هيدرولاز18. يكون فيه لب البروتين protein core ذو وزن جزيئي 40 كيلودالتون. ويعرف أيضا بالبروتين السكري الغضروفي البشري39 Human Carilage glycoprotein 39 (HC-gp39) ، أو البروتين1 المشابه للكيتيناز3 Chitnase 3- like protein1(CHI3L1) و البروتين الزليلي39 (39 kDa synovial protein) . وهو أحد أفراد مجموعة البروتينات المشابهة للكيتيناز عند الثدييات ولكنه لا يمتلك أية خصائص إنزيمية، كما لا يمتلك فعالية كيتيناز وهو بروتين مصلي محفوظ بشكل جيد [37,36] .

الاختصارات YKL-40 مستندة إلى الحرف الذي يرمز لأول ثلاث حموض أمينية طرفية في النهاية -N من بنية هذا البروتين وهي التيروزين(Y)، الليزين (K) والليوسين (L) والرقم 40 يشير إلى الوزن الجزيئي له[38].

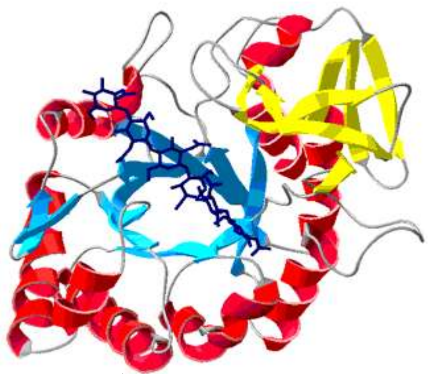
1-3 التركيب الكيميائي والبنية البلورية:

ينتمي هذا البروتين إلى عائلة الغليكوزيد هيدرولاز18 والتي تتضمن أيضاً الكيتينازات chitinases البكتيرية والنباتية، وهي بروتينات ذوابة تكون مفرزة أو داخل خلوية[39] .

تعرف الكيتينازات بأنها مركبات تحفز حلمهة الرابطةβ (4→1) للغلوكوزامين (GlcNAc) N-acetyl-D-glucosamin. وتتألف هذه البروتينات من 8 سلاسل ببتيدية متوازية (8 parell)، تملك جميعها بنية triose-phosphate isomerase (TIM). وهي تشطر الكيتينchitine (بوليمير غزير من 4→1 N استيل غلوكوزامين GlcNAc)، والذي يوجد في الهيكل الخارجي لمفصليات الأرجل، جدران الخلايا الفطرية وأغماد الديدان الطفيلية ولكن ليس في الفقاريات)[40] .

ثلاثية الحموض الأمينية المتعلقة بالحلمهة في بنية الكيتينازات هي الأسبارجين، الغلوتامين، الأسبارجين Asp, Glu, Asp. في حين أن الثمالات المقابلة لها في الـYKL-40 البشري هي (الأسبارجين، اللوسين، الأسبارجين) Asp, Leu, Asp. إن استبدال الـGlu بالـ Leu في YKL-40 البشري يحرمه الفاعلية كإنزيم حال للكيتين [41,40]. و على الرغم من أن الـ YKL-40 ليس له فاعلية كيتيناز لكنه يربط الكيتين والسكاكر القصيرة بسبب وجود شق clift كاره للماء لربط الركازة hydrophobic substrate binding cleft. ولذلك تم تصنيف YKL-40 كبروتين مشابه للكيتيناز أو لكتين مشابه للكيتيناز [41] .

يحتوي YKL-40 على سلسلة عديد ببتيد مفردة مؤلفة من 383 حمضاً أمينياً. وقد تم نشر تتالي الحموض الأمينية الكامل والدنا المتمم cDNA للـ YKL-40 البشري في عام 1993 من قبل Hakala et al [42]. ويوضح الشكل (16) البنية البلورية للـYKL-40.



الشكل (16) بنية الـ YKL-40 البشري مع ارتباط N-استيل غلوكوزامين [42]

تقسم البنية البلورية ثلاثية الأبعاد للـYKL-40 البشري إلى جزئين كرويين: الجزء اللبي الكبير والذي يتألف من 8 أجزاء $(\beta/\alpha)_8$ لها بنية triose-phosphate isomerase وجزء صغير مؤلف من 5 سلاسل β وحلزون α واحد، وهذه البنية تعطي الموقع الفعال من الـYKL-40 بنية مشابهة للثلم groove [43].

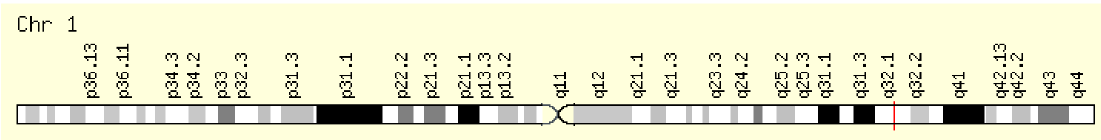
هنالك موقعان محتملان لعملية الارتباط بالغليكوزيل في YKL-40، حيث ترتبط النهاية الطرفية -NH2 بوحدتين من الغليكوزيل GlcNAc بارتباط β(1-4)، وإن وجود موقعي ارتباط مميزين مع ألفة انتقائية لقليلات السكريد يقترح أن YKL-40 يمكن أن يعمل من خلال الارتباط المتصالب cross-linking two targets. وتعد عملية الارتباط بالغليكوزيل Glycosylation ميزة فريدة لبنية الـYKL-40 على اعتبار أن الثمالة الموافقة للـArg لا تتواجد في الكيتينازات وتستبدل بالـ Pro في البروتينات الأخرى المشابهة للكيتيناز عند الثدييات [43,42].

يمكن لـYKL-40 أن يربط الهيبارين أيضاً، وإن تحليل تتالي الحموض الأمينية يظهر أنYKL-40 يحوي جزءً وحيداً رابطاً للهيبارين على الوجه الخارجي في العروة السطحية للبروتين المتطوي. وقد اقترح أن الهيباران سلفات هو الشكل المفضل من الهيبارين للارتباط بـYKL-40، وخاصةً الشدف غير الكبريتية منه، حيث أنها تتوافق مع ثلم الارتباط للـ YKL-40 [43-41].

2-3 الموقع الجيني

يدعى الجين الخاص بـYKL-40 CHI3L1 gene وهو يتوضع في منطقة مصونة بشكل كبير highly conserved على الصبغي رقم 1 في المنطقة 1q31-q32 [(45-44)]. ويوضح الشكل 17 موقع الجين الخاص بـYKL-40.

Start:	203,148,059 bp from *pter*
End:	203,155,922 bp from *pter*
Size:	7,864 bases
Orientation:	(55-54) minus strand



CHI3L1 Gene in genomic location: bands according to Ensembl, locations according to GeneLoc

الشكل(17) موقع جين CHI3L1 على الصبغي الأول عند الإنسان [(44)]

3-3 إفراز YKL-40

أثبتت العديد من الدراسات أن YKL-40 يفرز من عدة أنواع من الخلايا البشرية تتضمن البلاعم المفعّلة، الخلايا الغضروفية، الخلايا الزليلية synovial والخلايا البانية للعظم osteoplast، ولكن تأكد بشكل قاطع أنه يفرز أيضاً من خلايا العضلات الملساء الوعائية (VSMCs) و البلاعم، مما يؤكد دوره في الحالة المناعية [(47-46)].

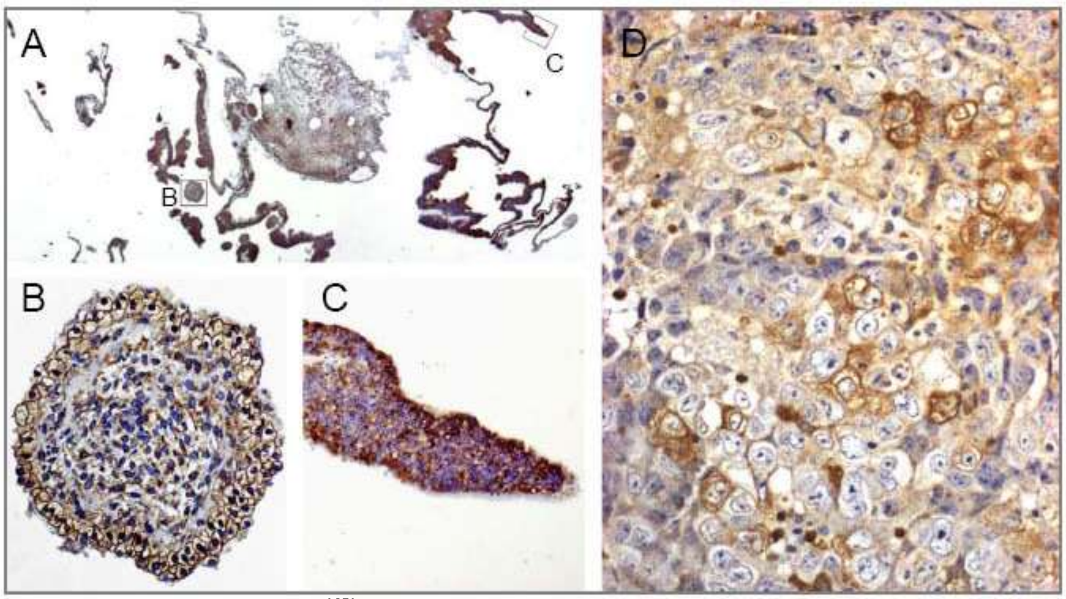
أما في العضوية فلقد لوحظ كل من YKL-40 mRNA والتعبير عن البروتين في خلايا البلاعم في أنسجة التهابية مختلفة في مناطق إعادة تشكل المطرس الخلوي extra cellular matrix remodellin [(47-46)].

4-3 وجود YKL-40 في الأنسجة عند الأصحاء

لقد تبين أن YKL-40 يُنتج من الخلايا الجذعية المضغية embryonic وطلائعها. إن التعبير عن الرنا المرسال والبروتين الخاص بـ YKL-40 يتم بشدة في كل الطبقات البرعمية germ layers للمضغة البشرية وفي أنسجة جنين الانسان في طبقات ecto-, meso- and

endoderm layers. يكون التعبير ،على المستوى الخلوي، مرتفعاً في أنسجة الجنين والمضغة والذي يلاحظ من خلال الانقسام السريع والتمايز الملحوظ، وكذلك في النسج التي تخضع لتبدلات شكلية-جينية Morphogenic. كذلك لوحظ إفراز عال في أنسجة الشخص البالغ الطبيعي وذلك في الخلايا ذات الفعالية الخلوية المرتفعة[48].

ويوضح الشكل 18 وجود YKl-40 في بعض المقاطع النسيجية[49].



الشكل (18): وجود YKL-40 في الأنسجة[49]

يظهر التعبير النسيجي عن YKL-40 عبر التحليل الكيميائي الهستولوجي المناعي في كل من:

(A) الخلايا المضغية البشرية (D) خلايا سرطانة المضغة البشرية
(B) مقطع مكبر من الخلايا المضغية البشرية في A وخاضع لعملة التلطيخ
(C) مقطع مكبر من الخلايا السرطانية المضغية البشرية في D وخاضع لعملة التلطيخ

5-3 تراكيز YKL-40 في البلازما عند المتطوعين الأصحاء

أجرى Bojesen وزملاؤه عام 2011[50] دراسة نشرت في شهر نيسان 2011، كان الهدف منها معرفة القيم المرجعية لـYKL-40 عند المتطوعين الأصحاء.

حيث جرى تحديد تركيز YKL-40 البلازمي عند 3130 متطوع بأعمار تتراوح بين 20-80 عاماً من مجموع الشعب الدانماركي. ولم يكن لديهم أي مرض معروف في زمن سحب العينة ما بين عامي 1991-1994 وبقوا أحياء وأصحاء خلال فترة 16 سنة من المتابعة. جرى

قياس YKL-40 مرة أخرى عند 644 متطوعاً في عينات أخذت بعد 10 سنوات من أخذ العينة الأولى.

في نتائج هذه الدراسة كانت القيمة الوسطى لـ YKL-40 هي 40 مكروغرام/ل، حيث تتراوح القيم المرجعية من 14-155 مكروغرام/ل وبدون وجود فروقات بين الجنسين (50). كما تبين أن YKL-40 يزداد بشكل أسي مع تقدم العمر. ومن أجل تعديل المستويات القياسية وفقاً للعمر فقد جرى اشتقاق المرتبة المئوية (YKL-40 percentile) والتي تضرب بقيمة YKL-40 لنحصل على القيمة المعدلة وفقاً للعمر[51-50].

$$YKL-40\ percentile = \frac{100}{\{1+(YKL-40^{-3})(1.062^{age})(5000)\}}$$

حيث تقدر قيم YKL-40 بالمكروغرام/لتر والعمر بالسنوات.

عند المتطوعين الذين جرى قياس YKL-40 لديهم مرتين بفارق 10أعوام، كانت الزيادة الوسطية mean increase لـYKL-40 هي 1.5 مكروغرام/لتر/العام بانحراف معياري 0.2. في حين أن التغير الوسطي في قيم YKL-40 المعدلة بعد ضربها بالمعامل السابق كان أصغري 0.3[50].

وبالتالي بينت هذه الدراسة أن تراكيز YKL-40 ازدادت بشكل ملحوظ مع تقدم العمر في كلا الجنسين. واعتماداً على نتائج هذه الدراسة الضخمة لمتطوعين أصحاء فقد اقترح أنه يجب اجراء تصحيح لقيم YKL-40 من خلال المعامل السابق[51-50].

6-3 طرق معايرة YKL-40 في البلازما

لكي يكون تحديد تراكيز YKL-40 في البلازما مفيداً سريرياً يجب استخدام طرق محددة، حساسة، رخيصة و سريعة وتؤمن قياسات موثوقة بزمن قياسي وبتكلفة معقولة.

الأكثر استخداماً تجارياً هو المعايرة بطريقة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA لتحديد الـYKL-40 البلازمي. حيث تستخدم آبار ميكروية مغطاة بالستربتافيدين، أضداد فأرية وحيدة

النسيلة مرتبطة بالبيوتين a biotinylated-Fab monoclonal mouse antibody موجهة ضد الـYKL-40 البشري (capture antibody) و أضداد أرنبية متعددة النسيلة موسومة بالفسفاتاز القلوية موجهة ضد الـYKL-40 البشري. إن حساسية هذه الطريقة هي 20مكروغرام/لتر، وحدود الكشف 8 مكروغرام/ل [52].

حديثا جرى تطوير تقنية جديدة لتحديد تراكيز الـYKL-40 البلازمية باستخدام proximity ligation assay (PLA). تستخدم هذه الطريقة ضدين مقترنين بنكليوتيدات قصيرة حيث يرتبط زوجا الضد بالبروتين الهدف، كما يزداد التركيز الموضعي للـ DNA قصير النكليوتيد للسماح بالربط الإنزيمي للسلسلتين. الـamplicons الناتجة تكون فريدة لكل بروتين محدد يجري كشفه ويمكن أن يقاس بطريقة كمية من خلال real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). تقنية PLA يكمن توسيعها للكشف المتزامن لعدد من البروتينات وهي طريقة عالية الحساسية وتتطلب 10مكرولتر فقط من البلازما [53]. ويجب أن لا تزيد الفترة الزمنية ما بين سحب عينة الدم وما بين التثفيل بدرجة حرارة الغرفة عن 8 ساعات لعينات EDTA البلازما وعن 3ساعات لعينات المصل، وإلا فسوف يلاحظ ارتفاعات واضحة وغير مرضية بتراكيزYKL-40 البلازمية [51-52].

إذا جرى تخزين الدم بدرجة 4مº قبل التثفيل فإن تراكيزYKL-40 تبقى ثابتة في عينة البلازما EDTA لـ72 ساعة وفي المصل لـ24ساعة، حيث يؤدي انحلال العدلات إلى تحرير YKL-40 . بعد فصل الخلايا الدموية، يبقى YKL-40 ثابتاً في البلازما المخزنة لفترة تصل إلى 5 أيام بدرجة حرارة الغرفة، ولمدة 9 أيام بدرجة حرارة 4م° وبدرجة حرارة -80م تصل الفترة إلى 14 سنة. التجميد وفك التجميد المتكرر لعدة مرات تصل إلى 9 ليس له أي تأثير على تراكيز YKL-40 البلازمي [51-52].

3-7 الدور الحيوي للـYKL-40

YKL-40 هو بروتين مفرز secreted protein مما دعى للاعتقاد بأن مكان عمله خارج خلوي. اعتبر الـ YKL-40 كمعلم جديد له علاقة بالالتهاب الحاد وقد تبين أن التراكيز المرتفعة منه توجد عند الأشخاص المصابين بأمراض التهابية أو بإعادة التشكل المتزايدة

remodeling أو السرطان. حيث جرت الإشارة إلى دوره في تطور الأمراض الالتهابية، السكري والعديد من السرطانات[54] .

إن الوظيفة الرئيسية للـ YKL-40 لا تزال غير محددة بدقة، كما لم يجر ،حتى الآن، تحديد مستقبلات له على سطح الخلية أو مستقبلات ذوابة. من المعروف حالياً أن YKL-40 يحفز نمو الأرومة الليفية، يفعل سبيل الـAKT (serine/threonine protein kinase) والـ phosphoinositol-3 kinase، وله تأثير مضاد للاستماتة antiapoptosis، وله وظيفة في توليد الأوعية angiogenesis، ويشارك في الاستجابة المناعية الفطرية[52-49].

كما يمكن أن تسبب زيادة الـYKL-40 الاعتلال البطاني من خلال تحفيز الانجذاب الكيميائي chemotaxis، ربط وارتحال الخلية cell attachment and migration ، إعادة التنظيم وتبدل شكل النسيج كاستجابة للأذية البطانية. يحرض YKL-40 هجرة خلايا العضلات الملساء الوعائية VSMCs (vascular smooth muscle cells) وتشكل النبيبات المتفرعة وهذا يقترح أن YKL-40 يلعب دوراً في توليد الأوعية[52-49].

3-7- خواص نمو

أظهرت الدراسات في الزجاج أن YKl-40 وضمن تراكيز فيزيولوجية يزيد توالد الخلايا الغضروفية، كما يعمل على زيادة اصطناع البروتيوغليكان للخلايا الغضروفية المزروعة[55].
ولقد أظهر Recklies وزملاؤه في عام 2002 أن YKL-40 يزيد معدلات نمو خلايا الأرومة الليفية[56].

إن الآلية التي يجري من خلالها تنبيه YKL-40 للخلايا الزليلية والأرومة الليفية الجلدية تتضمن إدخال الـ thymidine داخل الـ DNA الخلوي ويكون تأثيره مشابهاً للتأثير الذي يستحصل بواسطة عامل النمو المشابه للأنسولين (IGF-1) insulin-like growth factor-1[56،55].

لقد أظهرت هذه الدراسة أيضاً أن YKL-40 يطلق شلال mitogen-activated protein kinase (MAP) وشلال PI-3K (phosphoinositol 3- kinase) لنقل الإشارة في الأرومة الليفية، مما يؤدي إلى فسفرة إنزيمات خارج خلوية مسؤولة عن الانقسام

الخلويmitogenesis(56). وهذا يقترح دوراً لـYKL-40 كبروتين مضاد للاستماتة الخلوية anti-apoptotic protein. وكذلك إن تفعيل سبل نقل الإشارة الهيولية يقترح أن YKl-40 يتفاعل مع مكون أو أكثر من مكونات الغشاء الخلوي[56].

وبالمقابل أظهرت دراسة Ling وزملاؤه عام 2004 [57] أن YKL-40 يحدث تأثيراً مضاداً للهدم anti-catabolic effect، مما يؤدي إلى الحفاظ على المطرس خارج الخلوي Extra cellular matrix (ECM) خلال مراحل التخرب أو إعادة التشكل النسيجي[57].

يعمل YKL-40 كعامل جذب كيميائي لخلايا بطانة الأوردة السرية البشرية human umbilical vein endothelial cells وهو يحفز ارتحال هذه الخلايا بشكل مشابه لتأثير عامل الجذب الكيميائي البطاني الذي يدعى بـ(bFGF basic fibroblast growth factor. كما أنه يعدل مورفولوجية الخلايا البطانية الوعائية من خلال تحفيز تشكيل النبيبات المتفرعة branching tubules، مما يشير إلى أن YKL-40 قد يعمل على توليد الأوعية angiogenesis من خلال تحفيز ارتحال migration وإعادة تنظيم reorganization خلايا البطانة الوعائية[58].

لقد بينت الدراسة التي أجراها Nishikawa عام 2003[59] أن YKL-40 يحفز ربط الخلايا العضلية الملساء الوعائية، مما يؤدي لانتشارها وارتحالهاspreading and migration . مما يقترح أن للـ YKL-40 دور في تسريع مراحل تشكل اللويحات العصيدية، حيث يتم تحفيز الخلايا العضلية الملساء لترتحل عبر طبقة الحنون البطانية (intima) استجابة للإشارات الخارج خلوية [59].

وبالتالي اقترح أن YKL-40 قد يكون معلماً تشخيصياً للحالة الالتهابية حيث أنه لوحظت زيادة في التعبير عنه أثناء تطور الوحيدات monocytes إلى البلاعم macrophages، وأثناء تمايز الخلايا المتوسطية mesothelial إلى أرومة ليفية. كذلك لوحظت زيادة في تراكيزه عند تمايز الخلايا العضلية الملساء الوعائية، وعند تتمايز الخلايا الغضروفية إلى أرومة ليفية[59،58].

3-7-2 خواص رابطة للهيبارين

يحتوي YKL-40 على موقع محتمل لربط الهيبارين (location 144-147)، وهو يربط الهيبارين بألفة أكبر من الفيبرونكتين fibronectin (البروتين اللاصق للخلايا). حيث يرتبط YKL-40 بالهيبارين ومشابهاته على المطرس الخلوي ECM أو على سطوح الخلايا [60-58].

ولقد تبين بطريقة البلورة أن الهيباران سلفات يرتبط مع YKL-40 بألفة فيزيولوجية أكبر من الهيبارين. حيث يفيد الهيبارين الرابط للـYKL-40 في العديد من الوظائف من الاستيقاف البسيط simple immobilization أو الحماية من التدرك، إلى تعديل وظائف بيولوجية محددة. كما قد يفيد في ايصال عوامل النمو [مثل الـFGF (Fibroblast Growth Factor) و vascular endothelial growth factor (VEGF) و epidermal growth factor (EGF)] إلى مستقبلاتها الملائمة على الأرومة الليفية والخلايا البطانية من أجل نقل إشارة نمو نسيجي جديدة وذلك خلال مراحل ترميم الخلايا[61].

3-7-3 خواص رابطة للكيتين

لقد اقترح أن إنزيمات الـchitotriosidase البشرية التي ينتمي إليها YKL-40 تلعب دوراً في مناعة المضيف عبر تدرك degradation جدران الخلايا الحاوية على الكيتين للممرضات الفطرية[62].

وباعتبار أنه يفرز من قبل البلاعم macrophages و العدلات neutrophils، والتي تعمل في آليات الدفاع الأولية ضد العوامل الممرضة، فلقد اقترح أنYKL-40 يمكن أن يشارك بالاستجابة المناعية كمادة طاهية opsonin (مادة ترتبط بالمستضد فتهيئه للبلعمة)[63]. كما تبين أن YKL-40 قد يعمل كمتحسس للكيتين chitin sensor، مؤدياً لإطلاق المناعة الفطرية ومساعداً في توجيه البلاعم macrophages إلى مكان الغزو، كما يمكن أن يكون له دور في تنظيم الاستجابة المناعية الناتجة التي تحدث نتيجة الإنتان [64].

3-7-4 التأثير على اصطناع الهيالورونان

الهيالورونان هي عديد سكريد خطي مؤلف من تكرار وحدات ثنائية السكريد لـ N-أسيتيل غليكوزأمين و D-glucoronate. يوجد الهيالورونان في المطرس خارج الخلوي في العديد

من الأنسجة وهو يصطنع من قبل الخلايا الغضروفية ،الخلايا الزليلية في الغشاء الزليلي الملتهب، الخلايا العضلية الملساء في الأوعية المتأذية، الخلايا النجمية الكبدية في التليف الكبدي، خلايا الأرومة الليفية في أنسجة الجلد ومن خلايا السرطان. ويمتلك الهيالورونان العديد من الأدوار الفيزيولوجية ولقد جرى الربط بينه وبين التخلق المضغي embryogenesis، العمليات المورفوجينية morphogenetic processes، توالد الخلية وإعادة التهايؤ النسيجي tissue remodeling وهو متورط في الاستجابات الالتهابية المناعية المزمنة والحادة[65].

إن التعبير عن YKL-40 قد يرتبط بوظائف الهيالورونان، وليس من المعروف إذا كان YKL-40 يربط الهيالورونان، ولكن أظهرت الدراسات أن YKl-40 يملك موقعين محتملين لربط الهيالورونان وهما (location 147-155 and 369-377). قد يستطيع YKL-40 تمييز الهيالورونان أو طلائعه كركازة ويتداخل بآلية اصطناعه، الأمر الذي يؤثر على مستويات الهيالورونان في المطرس خارج الخلوي وبالتالي يؤثر على مدى الالتصاق والتبعثر الخلوي خلال مراحل إعادة التهايؤ النسيجي الذي يحصل خلال الالتهاب، التليف، التعصد والانتقال الورمي metastasis[59،58].

8-3 تنظيم إفراز YKL-40

1-8-3 تأثير المطرس خارج الخلوي

أشارت العديد من الدراسات إلى أن التبدلات في المطرس الخارج خلوي تكون مرتبطة بالتغيرات في اصطناع YKL-40. فلقد تبين أن التغيرات في بيئة المطرس الخارج خلوي في خلايا الأرومة الليفية تؤثر على إنتاج YKL-40 من قبل هذه الخلايا.

أجري تحليل المصفوفة الصغرية للتعبير عن الجين Microarray gene expression analysis لخلايا غضروفية بشرية. حيث زرعت الخلايا في وسطين أحدهما يسمح لها بالحفاظ على نمطها الظاهري المتمايز والآخر يعمل على إزالة تمايز الخلايا. وأظهرت النتائج زيادة التعبير عن YKL-40 4 مرات أعلى في الخلايا الغضروفية البشرية التي أزيل تمايزها dedifferentiated مقارنة بالخلايا الغضروفية المتمايزة[66].

تنتج الخلايا الغضروفية الطبيعية المزروعة كميات قليلة من YKL-40 خلال الأيام الأولى من زرعها وبعد عدة أيام يزداد إفرازه. كذلك يزداد أيضاً تحفيز إفراز YKL-40 لدى حصول أذية القطع الجزئي للغضروف ولدى إزالة الخلايا الغضروفية من بيئة المطرس الخلوي الأصلية الخاصة بها، حيث تبين أن الإفراز يتعلق بتشكيل المطرس الخارج خلوي [67].

2-8-3 تأثير السيتوكينات وعوامل النمو

إن الدراسات التي أجريت حول تأثير السيتوكينات وعوامل النمو على إفراز YKL-40 لاتزال قليلة. أظهرت الدراسة التي أجراها Johansen وزملاؤه عام 2001[67] أن الـ IL-1 يثبط التعبير عن الرنا المرسال الخاص بـYKL-40 ويقلل إفرازه من قبل الخلايا الغضروفية البشرية، كما أن عامل النمو (Transforming growth factor β (TGF β يقلل من التعبير عن الرنا المرسال الخاص بـYKL-40 واصطناعه في الخلايا الغضروفية البشرية [67].

وبالمقابل لوحظ أن إفراز YKL-40 في الخلايا الغضروفية المعزولة حديثاً يحفز من قبل IL-6 وهو سيتوكين له دور مهم في تسلسل العمليات الالتهابية [68]، ومن قبل IL-17 وهو سيتوكين ماقبل التهابي له دور في التهاب المفاصل[69]. وتبين أن كلاً من المركبات التالية TNF α، عامل النمو المشتق من الصفيحات (PDGF)، dexamethasone ليس لها تأثير على إنتاج YKL-40 من قبل الخلايا الغضروفية المزروعة[67].

قام Nielsen وزملاؤه عام 2011[70] بدراسة على مجموعة من الرجال الأصحاء بهدف دراسة الدور المحتمل لـ IL-6 وعامل النخر الورمي TNF-α في تنظيم مستويات YKL-40 البلازمية.

يعرف IL-6 بأنه سيتوكين غليكوزيلي متعدد الوظائف ينظم العديد من سمات ومظاهر العمليات الالتهابية وكذلك تكون الدم haematopoiesis. وهو ينتج من قبل أنواع عديدة من الخلايا كالخلايا اللمفاوية والبلاعم وحيدة الخلية والخلايا المعوية والخلايا النجمية astrocytes والخلايا البطانية. وهو يمتلك تأثيراً منظماً لوظائف الخلايا التائية والبائية، ومحفزاً قوياً لبروتينات الطور الحاد (العامل المنبه للخلية الكبدية HSF) وينظم تكون الصفيحات thrombopoiesis [70].

جرى إعطاء إما الـIL-6 البشري المأشوب recombinant human IL-6 ($n = 6$)، أو rhTNF-α ($n = 8$)، أو سواغ vehicle ($n = 7$) لمدة 3 ساعات. فكانت مستويات البلازما لكل من IL-6 و TNF-α على الترتيب 150 و 18 pg/ml خلال التسريب[70].

لقد لوحظ أنه بعد تسريب IL-6 زادت تراكيز YKL-40 البلازمي من 30 نانوغرام/مل وسطياً إلى 57 نانوغرام/مل خلال 24 ساعة. وعادت القيم إلى التراكيز الطبيعية بعد 48 ساعة. في حين أن تراكيز YKL-40 لم تتبدل خلال تسريب TNF-α أو عند تسريب السواغ. وهذه المعلومات أظهرت أن الدور الأكبر في ضبط تراكيز YKL-40 البلازمية خلال الالتهاب يعود إلى IL-6 وليس لـ TNF-α [70].

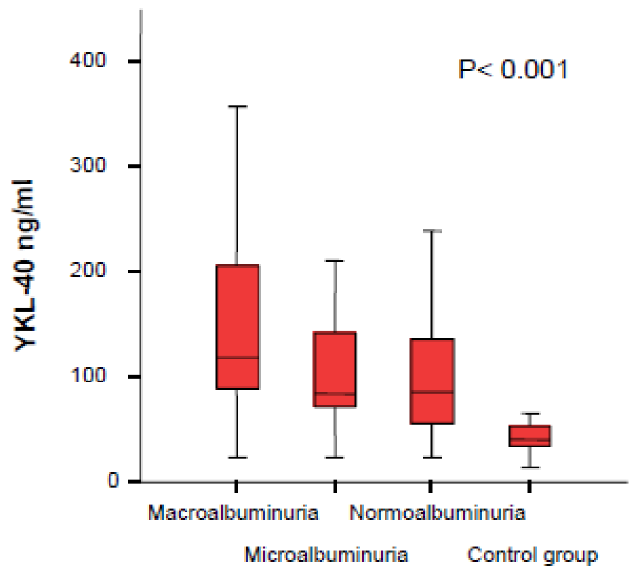
3-9 دور YKL-40 في بعض الحالات المرضية

3-9-1 YKL-40 و الداء السكري

بينت الدراسات الحديثة أن مرضى السكري نمط1 ونمط2 لديهم تراكيز مرتفعة من YKL-40. وتكون هذه المستويات عند مرضى السكري نمط2 مترافقة مع المقاومة للأنسولين ومستوى الشحوم السكري diabetic lipid profile. كما تبين أن YKL-40 يترافق مع الواسمات السكرية مثل الهيموغلوبين السكري A1c، و الغلوكوز الصيامي[71←75].

أجرى العالم Røndbjerg وزملاؤه عام 2011 دراسة في الدانمارك على 105 مرضى بالداء السكري نمط2 لديهم قيم مرتفع للبيلة البروتينية والتي تترافق عادةً مع ارتفاع خطر الإصابة بالأمراض القلبية الوعائية[71]. وتبين أن مستويات الـYKl-40 البلازمية كانت مرتفعة لدى مرضى الداء السكري نمط2 مقارنة بالأصحاء، وكانت مرتفعة بشكل أكبر لدى مرضى السكري الذين لديهم اعتلال كلية سكري. وتبين أن ارتفاع تراكيز YKL-40 كان مترافقاً مع ارتفاع معدل albumin/creatinine- البولي لدى كل المجموعات. كما لوحظ توافق ملحوظ مع العمر، فترة الإصابة بالسكري، ضغط الدم الإنقباضي، مستويات الشحوم، الهيموغلوبين السكري و مشعر HOMA-IR. كما لوحظ توافق واضح مع البيلة البروتينية. (الشكل 19).

وخلصت الدراسة إلى أن مستويات YKL-40 ترتفع لدى مرضى الداء السكري وتترافق بشكل مستقل independent association مع زيادة البيلة البروتينية. وهذا يقترح دوراً لـYKL-40 في استمرار وتتطور المضاعفات الوعائية للداء السكري[71].



الشكل (19) الارتباط الايجابي بين ارتفاع قيم البيلة الألبومينية وزيادة تراكيز YKL-40 عند مرضى السكري نمط2 [71]

ولقد بينت هذه الدراسة أنه كلما ارتفعت قيمة البيلة البروتينية عند مريض السكري نمط2 ازدادت تراكيز YKl-40 بشكل أسي بدءاً من المجموعة الشاهدة مروراً بمرضى السكري الذين لديهم بيلة بروتينية طبيعية Normoalbuminuria ثم البيلة البروتينية الصغرى فالبيلة البروتينية الكبرى[71].

كذلك أجرى العالم Persson وزملاؤه [72] دراسة نشرت في أبريل عام 2012 على 290 مريض بالسكري نمط2. وبينت النتائج ارتفاع معدل الوفيات العام وارتفاع معدل الوفيات بالأمراض القلبية الوعائية بالترافق مع ارتفاع تراكيز YKL-40 البلازمية لدى المرضى. وخلص الباحثون إلى أن التراكيز المرتفعة من YKL-40 تشكل متنبئاً للوفاة لدى مرضى الداء السكري نمط2 [72] .

كما قام Rathcke وزملاؤه[73] عام 2006 بدراسة 87 مريض بالداء السكري نمط2 من العرق القوقازي، لم يكن لديهم أعراض سريرية أو كيميائية حيوية لوجود مضاعفات للداء السكري، فجرى قياس المقاومة للأنسولين من خلال مشعر الـHOMA-IR (Homeostatic Model Assessment to quantify Insulin resistance). أظهرت هذه الدراسة أن مرضى السكري نمط2 كان لديهم مقاومة أعلى للأنسولين ومستويات بلازمية مرتفعة من YKL-40، وكان هذا الأخير مرتبطاً مع HOMA-IR ومع ثلاثيات الغليسيريد ولم يلاحظ ترافق بينه وبين hsCRP. وبالتالي اعتبر الـYKL-40 واسماً يمكن مقارنته مع مجموعة من الواسمات المترافقة مع السكري نمط 2 والمقاومة على الأنسولين[73] .

كذلك درس Nielsen وزملاؤه عام 2008[74] إمكانية اعتبار YKL-40 كواسم للبدانة عند مرضى السكري. حيث جرى تقصي كل من YKL-40 البلازمي و الرنا المرسال الخاص به في النسيج الشحمي، عند 199 متطوعاً تم تقسيمهم إلى 4 مجموعات اعتمادا على وجود أو غياب الداء السكري نمط 2 ووجود أو غياب البدانة. بالإضافة إلى ذلك جرى قياس YKL40 البلازمي عند المتطوعين الأصحاء خلال فترة ارتفاع الغلوكوز (حيث بقيت تراكيز الغلوكوز البلازمي للمتطوعين عند 15ممول ولمدة 3 ساعات). بينت هذه الدراسة أن مرضى السكري نمط2 لديهم مستويات بلازمية مرتفعة من YKL-40 بالمقارنة مع المتطوعين الأصحاء، ولكن لم يكن لديهم تعبير مرتفع عن الرنا المرسال الخاص بـYKL-40 في النسيج الشحمي. ولم يظهر في الدراسة أي اختلاف في تراكيز YKL-40 البلازمية أو مستويات الرنا المرسال الخاص بـYKL-40 في النسيج الشحمي بين الأشخاص البدينين السكريين والأشخاص البدينين غير السكريين. كما أظهر التحليل الإحصائي أن YKL-40 البلازمي كان مترافقاً مع غلوكوز البلازما الصيامي وIL-6 البلازمي.

تبين أن YKL-40 البلازمي لم يكن مرتبطاً بمناسب البدانة كالـ BMI (Body mass Index) ونسبة محيط الخصر إلى الورك (waist/hip ratio (WHR. كما لم تكن هنالك تبدلات في تراكيز YKL-40 البلازمي عند المتطوعين الأصحاء خلال فترة ارتفاع الغلوكوز أو خلال نوبة ارتفاع الأنسولين مع بقاء الغلوكوز طبيعياً. وبالتالي جرى اعتبار YKL-40

البلازمي كواسم للداء السكري نمط2 مرتبط بغلوكوز البلازما الصيامي ومستويات IL-6 البلازمية وغير مرتبط بالبدانة[74].

ذكر Hoellerl وزملاؤه [75] في دراسة أجريت في النمسا عام 2011 أنه يمكن اعتبار الـYKL-40 واسماً لتمزق اللويحات Plaque rupture وأنه يرتفع في المراحل المبكرة من اعتلال الكلية السكري عند مرضى السكري نمط2 والذي يشخص بالبيلة البروتينية والمضاعفات الوعائية الصغرى والكبرى [75].

حيث جرى التقصي عن الـYKL-40 عند مرضى السكري نمط2 وفي مستويات ألبومينية مختلفة ودرست علاقته بالإصابة القلبية، حيث قسّم مرضى السكري في هذه الدراسة إلى 3 مجموعات (بدون بيلة ألبومينة، بيلة ألبومينية صغرى، بيلة ألبومينة كبرى). وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن المجموعات الثلاثة اختلفت بشكل ملحوظ بتراكيزYKL-40، حيث كانت القيم الأعلى لدى مجموعة البيلة الألبومينية الكبرى وتلتها مجموعة البيلة الألبومينية الصغرى[75].

كذلك بينت الدراسة وجود تراكيز مرتفعة من YKL-40عند مرضى السكري نمط2 الذين لديهم أمراضاً وعائية كبرى macrovascular disease مقارنة بأولئك الذين ليس لديهم هذه الأمراض الوعائية. كما لوحظت تراكيز أعلى من YKL-40 لدى المرضى الذين لديهم اعتلال شبكية (وهو أحد الأمراض الوعائية الصغرى) مقارنةً بأولئك الذين ليس لديهم اعتلال شبكية [75].

وبهدف معرفة إمكانية تورط YKL-40 في العبء القلبي الوعائي عند الأشخاص المصابين بالبدانة المرضية Morbid Obesity) MO) أجرى Hempen وزملاؤه عام 2009 [76] دراسة على عدد من الأشخاص المصابين بداء البدانة المرضية، حيث أنه من المعروف أن هؤلاء المرضى لديهم خطر متزايد للوفاة بالأمراض القلبية الوعائية. ويعتقد أن سبب هذا الخطر القلبي الوعائي عند هؤلاء المرضى هو حالة تحت التهابية sub-inflammatory state تحدث من خلال إفراز متزايد لبروتين (MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1 من قبل النسيج الشحمي، الأمر الذي يؤدي إلى المقاومة للأنسولين والداء السكري نمط2. جرى في هذه الدراسة تحديد مستويات YKL-40 عند

مرضى MO قبل وبعد فقدان الوزن، وكذلك جرى تقصي العلاقة بين IR،YKL-40 و MCP-1 وبين البدانة [76].

أظهرت النتائج أن المستويات المرتفعة لـYKL-40 عند مرضى MO انخفضت بعد الفقدان الكبير للوزن، إجراء العملية الجراحية bariatric surgery. وأن YKL-40 كان مترافقاً مع منسب HOMA-IR ومستويات الأنسولين الصيامي، مما يدل على دوره في تقدم حالة المقاومة للأنسولين والسكري نمط2. واستنتج أن الترافق الوثيق بين MCP-1 وبين YKL-40 يشير إلى دور رئيسي ومشترك لكلا البروتينين في زيادة خطورة الوفاة بالأمراض القلبية الوعائية عند مرضى البدانة المرضية MO [76].

أجريت دراسة أخرى من قبل Schaller وزملاؤه عام 2010 على مرضى السكري الحملي وهو من المضاعفات الشائعة والمتزايدة للحمل. ولا تزال الآلية الالتهابية الرئيسية لهذا المرض غير واضحة تماماً. وبما أن YKL-40 من الواسمات الالتهابية الجديدة والتي ثبت وجود ترافق بينه وبين السكري نمط 2 فلقد دُرس التوافق بين YKL-40 والسكري الحملي GDM [77].

شملت الدراسة 58 متطوعة حاملً، 28 منهن مريضات بالسكري الحملي و30 منهن حاملاً سليمة وجرى تقييم عوامل الخطورة الرئيسية للسكري الحملي (الوزن وBMI قبل الحمل، القصة العائلية، قصة سكري حملي سابق، ولادة أطفال بوزن زائد). وأجري اختبار تحمل الغلوكوز الفموي Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) وقياس YKL-40 في الأسبوع 28 من الحمل وكذلك في الأسبوع الثامن بعد الولادة.

أظهرت الدراسة أن تراكيز YKL-40 لم تختلف بين مريضات GDM والمتطوعات الأصحاء سواء خلال الحمل أو بعد الولادة. وبالتالي هذا يقترح وجود حالة التهابية متشابهة في فترة قياس تركيز YKL-40 في المجموعتين. وهذا يمكن تفسيره بقصر فترة التبدلات الاستقلابية خلال السكري الحملي على عكس ما يحصل في حالة السكري نمط2. كما لوحظ أن YKL-40 كان مترافقاً مع الإنسولين، HOMA-IR والـBMI لدى المريضات [77].

درس Hyun وزملاؤه عام 2012$_{(78)}$ دور عدد من السيتوكينات الحديثة (YKL-40، chemerine، omentine-1)، التي تفرز من عدد من الخلايا بما فيها الخلايا الشحمية،

الخلايا البطانية والخلايا الالتهابية في التنبؤ عن مرض الشريان التاجي CAD لدى مرضى الداء السكري نمط2. وتبين وجود مستويات مرتفعة من YKL-40 ومستويات منخفضة من HDL لدى أفراد الدراسة الذين ظهر لديهم حالة تضيق stenosis مقارنة بالأفراد الذين لم يظهر لديهم تضيق. أما مستويات الـchemerine والـ omentine-1 فلم يلاحظ اختلاف بتراكيزها بين أفراد المجموعتين(78). واستنتج Hyun أن YKL-40، الذي يفرز في المراحل المبكرة من العملية الالتهابية، كان مترافقاً مع عدة عوامل خطورة للإصابة بالـCVD وأنه قد يترافق مع الداء الشرياني التاجي لدى مرضى الداء السكري نمط2 [78].

نشرت دراسة حديثاً أجراها Lin[79] وزملاؤه عام 2012 على 628 مريضاً بالداء السكري نمط2 بهدف معرفة الدور المحتمل لارتفاع YKL-40 في زيادة خطورة الإصابة بالمضاعفات القلبية الوعائية لدى هؤلاء المرضى. وتبين أن تراكيز YKL-40 البلازمية تشكل متنبئاً مستقلاً ولمدة 10 أعوام للوفيات بالأمراض الوعائية [79].

ويمكن القول أن مجمل الأبحاث التي أجريت على YKl-40 البلازمي لدى مرضى السكري نمط2 أكدت وجود ارتفاع واضح له عند هؤلاء المرضى، كما أظهرت ترافقه الايجابي مع المقاومة للإنسولين، البيلة الألبومينية، اعتلال الشبكية والمضاعفات الوعائية الصغرى والكبرى للسكري. في حين لم يكن مرتبطاً بالبدانة ومشعراتها ولم يرتفع في حالات السكري الحملي. كما بينت الدراسات ارتباط الـYKL-40 بمعالم التهابية كالـIL-6 وعدم ارتباطه بمعالم أخرى مثل hsCRP وأن ارتفاعه يزيد من خطورة الإصابة بالأمراض القلبية الوعائية لدى مرضى السكري البدينين[79-71].

2-9-3 YKL-40 في الاعتلال البطاني والتصلب العصيدي

تشير مشاركة YKL-40 في الحالة الالتهابية وتطور الأحداث الوعائية vascular processes إلى أنه ربما يلعب دوراً في الاعتلال البطاني والتصلب العصيدي. ويبدو أن المستويات المرتفعة من YKL-40 في الاعتلال البطاني متورطة بالعلاقة مع هجرة الخلايا cell migration، إعادة التنظيم reorganization وإعادة هيكلة الأنسجة tissue remodeling كاستجابة للأذية البطانية [80].

أجريت بعض التجارب في المختبر in vitro على خلايا VSMCs (وهي خلايا ناتجة من زرع خلايا الأبهر الصدري الخنزيري) بهدف محاكاة التبدلات العضوية التي تحصل في هذه الخلايا الحية(in vivo). حيث تبين أن هذه الخلايا تقوم باصطناع YKL-40 خلال فترة تحولها من المزرعة أحادية الطبقة monolayer culture إلى المزرعة متعددة الطبقات المتمايزة غير المتناسلة non-proliferating differentiated multilayer culture ، ويستمر إفراز YKL-40 خلال مرحلة إعادة الترتيب للخلايا، حيث تتشكل العقيدات المتعددة الخلية multicellular nodules. تعيد الخلايا في هذه العقيدات التعبير عن واسمات markers لخلايا VSMCs متمايزة. وتحاكي هذه العمليات التبدلات الداخل عضوية In vivo في خلايا VSMCs بعد الأذية حيث يزال تمايز الخلايا العضلية الملساء الوسيطة media smooth muscle cells dedifferentiate، ثم تهاجر migrate، وتسهم في تقدم مراحل عود التضيق restenosis وتشكل بطانة جديدة neointima [81] .

أظهرت الدراسات في المختبر in vitro أيضاً أن YKL-40 يحفز الانجذاب الكيميائي، ربط الخلية، نشر وهجرة الخلايا البطانية الوعائية. مما يقترح دوراً لـYKL-40 في تشكل اللويحات العصيدية، حيث تحفز الخلايا العضلية الملساء ثم تهاجر من خلال الطبقة البطانية intima استجابةً للإشارات خارج الخلوية[81].

يعدّل YKL-40 أيضاً بنية الخلايا البطانية الوعائية من خلال تحفيز تشكل التغصنات النبيبية branching tubules، مما يشير إلى أن YKL-40 قد يلعب دوراً في تشكل الأوعية angiogenesis من خلال تحفيز ارتحال وإعادة تنظيم الـ VSMCs [82,81] .

هذه الدراسات التي أجريت في المختبر دُعمت بالتحليل الكيميائي النسيجي المناعي الذي أظهر داخل العضوية تعبيراً عن بروتين YKL-40 في خلايا العضلات الملساء الوعائية في اللويحات العصيدية [82,81]. كما لوحظ وجود تعبير عن الرنا المرسال الخاص بـ YKL-40 بشكل كبير في البلاعم macrophages ضمن اللويحات العصيدية، والتي تتشكل نتيجة ارتشاح الوحيدات إلى الفراغ تحت البطاني لجدار الوعاء ومن ثم تراكم الشحوم في البلاعم

المفعلة. ولقد أظهرت البلاعم التي ترتشح عميقاً في مكان الآفة lesion تعبيراً مرتفعاً عن الرنا المرسال الخاص بـYKL-40 [83,82] .

كما أظهرت دراسة في المختبر مع التركيز والتشديد على اكتشاف واسم حيوي للتصلب العصيدي بفضل تقنية الـproteomics ارتفاع مستويات YKL-40 في الطافي من البلاعم وذلك بعد تعريضها لـLDL المؤكسد، وهي عملية تحاكي تشكل الخلايا الرغوية الـ foam cells. هذا أيضاً يقترح دوراً لـYKL-40 في تمايز الوحيدات إلى بلاعم محملة بالشحوم خلال تشكل اللويحات العصيدية [83].

3-9-3 YKL-40 في الأمراض القلبية الوعائية:

أشارت العديد من الدراسات خلال السنوات الأخيرة إلى ارتفاع مستويات YKL-40 في العديد من الحالات القلبية الوعائية كما وصف ترافق ايجابي بين YKL-40 والوفيات، وتبين أن المستويات المرتفعة من YKL-40 تترافق بشكل مستقل مع وجود داء القلب الإقفاري CAD (coronary arterial disease) والذي يحدد من خلال عدد الأوعية الدموية المتضيقة التي تظهر خلال تصوير الأوعية التاجية coronary angiography [84]. تشير هذه الاكتشافات إلى أن مستويات YKL-40 يمكن أن تكون مشعر كمي لتطور المرض إضافة لكونها مشعراً لوجود المرض [84] .

وفي دراسة أجراها Marott وزملاؤه عام 2012 على مجموعة من المرضى المصابين بالرجفان الأذيني arterial fibrillation (AF) تبين وجود مستويات مرتفعة من YKL-40. كما لوحظ أن مستوياته تكون أعلى عند مرضى الرجفان الأذيني الدائم permanent AF مقارنة بالذين لديهم رجفان متقطع persistent AF [85].

كذلك سجلت مستويات مرتفعة من YKL-40 عند المرضى الذين يعانون من الاحتشاء القلبي Myocardial Infraction (MI)، وبقيت مستويات YKL-40 مرتفعة عند أولئك الذين لديهم حالة احتشاء سابقة مقارنة بالذين لم يسبق لديهم حدوث حالة احتشاء. ولم يلاحظ فارق في مستويات YKL-40بين مرضى الاحتشاء من نوع STEMI أي المترافق بارتفاع في الموجة ST (ST Elevated Miocardial Infraction) ومرضى الاحتشاء غير المترافق مع

ارتفاع الموجة ST والذي يرمز له بـ NSTEMI أو (Non ST Elevated Miocardial Infraction) ، ولكن كانت هناك مستويات أعلى عند المرضى المستخدمين للأدوية الحالة للخثرات thrombolyzed patients مقارنة بالمرضى غير المستخدمين لهذه الأدوية non-thrombolyzed patients خلال أول 24 ساعة بعد تناول حالات الخثرة، مما يشير إلى أن YKL-40 يتحرر من الخثرة المنحلة dissolved thrombosis [85].

كما أظهر العالم Marott وزملاؤه عام 2010 أن المستويات المرتفعة من YKL-40 تترافق مع زيادة معدل الوفيات عند مرضى الشرايين التاجية Coronary Artery Disease CAD. كما سجل حدوث ترافق بين زيادة معدل الوفيات و زيادة مستويات YKL-40 خلال فترة 5 أعوام عند مجموعة من الأشخاص بأعمار تزيد عن 50 عاماً وبدون أن يكون لديهم سكري أو مرض قلبي وعائي. ومنه تم اعتبار أن YKL-40 يشكل متنبئ مستقل independent predictor للوفيات بشكل عام والوفيات من الحوادث القلبية الوعائية بشكل خاص [86].

وخلص الباحثون إلى أن هذه النتائج تقدم YKL-40 كمعلم توجيهي وتشخيصي محتمل possible screening modality/diagnostic marker من أجل مراقبة تطور التصلب العصيدي التاجي. وإن YKL-40المصلي يمكن أن يستخدم لضبط كفاءة وقدرة العلاج الدوائي لمرضى الـCAD، وبالتالي مساعدة الطبيب في تقليل الحدوث المتكرر للأحداث القلبية الوعائية [84-86].

3-9-4 YKL-40 والسرطان

لقد وجد أن مستويات YKL-40 المصلية ترتفع في حالات سريرية أخرى ليست مرتبطة بشكل مباشر بالتصلب العصيدي، السكري أو الأمراض القلبية الوعائية. فلقد وصفت العديد من الدراسات ارتفاع مستويات YKL-40 في أنواع مختلفة من مرض السرطان. يبدو أن مستويات YKL-40 ترتبط بمرحلة وعبء burden الورم، نقصان فترة عدم حدوث النكس (الـ recurrence-free) وكذلك نقصان فترة عدم ظهور أعراض المرض (الـdisease-free) والمعدل العام للوفيات [87].

إن الدور الحيوي الفعلي لـYKL-40 في مرض السرطان غير معروف، لكن يبدو أنه يلعب دوراً مهماً في الغزو الورمي tumor invasion. ومن المرجح أن له دور في تكاثر وتمايز الخلية، الالتهاب، الوقاية من الاستماتة، تحفيز توليد الأوعية angiogenesis ، وتنظيم إعادة تهايؤ النسيج الخارج خلوي [87] .

تبين أن YKL-40 يتواسط تأثير كل من سبيلي الإشارة MAPK/ERK1/2 (Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinases) و PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-kinase/ serine-threonine protein kinase) ويعد هذان السبيلان مهمين critical في النمط الظاهري الورمي للورم الأرومي الدبقي glioblastoma، كما تبين أنهما يسيطران على التكاثر والبقيا proliferation and survival ، الغزوانية ومقاومة الأشعة invasiveness and radiation resistance، وإنقاص حدوث الاستماتة الخلوية وزيادة درجة الورم. مع ذلك، لم تعرف حتى الآن الربيطة الوظيفية للموقع الرابط للكيتين في YKL-40 والتي لها علاقة بالسرطان [88].

أظهرت دراسة جرت في المختبر أن التعبير الشاذ عن YKL-40 في خلايا سرطان الثدي والقولون أدى إلى تشكيل ورم ذو نمط ظاهري مولد للأوعية منتشر extensive angiogenic phenotype، وأن بروتين YKL-40 المؤشب recombinant YKL-40 protein عزز عملية توليد الأوعية البطاني vascular endothelial cell angiogenesis، في حين أن حصار (blockade) YKL-40 أدى إلى كبح عملية تولد الأوعية في كل من المختبر وفي الاحياء [88] .

بالإضافة إلى ذلك، أظهر التحليل النسيجي المناعي لسرطان الثدي البشري ترابطاً بين التعبير عن YKL-40 وكثافة الوعاء الدموي. لذا، يمكن أن يفسر وجود مستويات مرتفعة من YKL-40 في السرطانات العالية التقدم والتمايز highly differentiated and advanced cancers وحالات السرطان الناكس من خلال دوره في إعادة توليد الأوعية وتكوين الألياف angiogenesis and fibrogenesis، طالما أن الأورام عالية التمايز تشخص عادة من خلال زيادة تشكل الأوعية high vascularization والتطوي الشديد للمطرس خارج

الخلوي high turnover of extracellular matrix[88]. ولوحظ أن ارتفاع YKL-40 المصلي عند مرضى سرطان الثدي النقائلي وسرطان القولون يترافق بإنذار أسوأ مقارنة بالمرضى الذين لديهم تراكيز YKl-40 مصلية طبيعية، وأنه يجب إجراء دراسات أعمق لتحديد الدور الفيزيولوجي للـYKL-40 في سرطان الثدي [89].

إن YKL-40 ليس نوعياً للأورام، والدراسات حتى الآن تصف YKL-40 كمعلم استقصائي screening marker للسرطان وكمعلم مفيد لرصد تباين النتائج العلاجية [89].

3-9-5 YKL-40 في حالات مرضية أخرى:

أظهرت العديد من الدراسات أن الـYKL-40 هو مستضد ذاتي في التهاب المفاصل الروماتيزمي، حيث تبين أنه يرتفع عند المرضى الذين كان لديهم المرض فعّال سريرياً، ثم تنخفض تراكيزه عندما يصبح المرض غير فعال(90). وبالتالي استنتج أن تراكيز YKL-40 تتعلق بفعالية وتطور المرض. كما أظهرت الدراسات بأنه يفرز أولا بشكل موضعي في المفصل الملتهب، ثم يتبع ذلك ارتفاع في YKL-40 المصل. وبالتالي خلص الباحثون إلى أن YKL-40 يمكن أن يشكل أداة جديدة لدراسة فاعلية وفيزيولوجية مرض التهاب المفاصل الروماتيزمي [90].

حددت دراسة أخرى تراكيز YKL-40 في 134 عينة من السائل الدماغي الشوكي (CSF) لمرضى يرجح إصابتهم بالتهاب السحايا مقارنة بمجموعة من الأشخاص الأصحاء، وتبين أن تراكيز YKL-40 في الـCSF كانت أعلى بشكل ملحوظ عند مرضى التهاب السحايا مقارنة بالأشخاص الأصحاء. كذلك بينت الدراسة أن YKL-40 يميل لأن يكون افرازه موضعياً، كون المرضى المصابين بالتهاب الجهاز العصبي المركزي كان لديهم تراكيز YKL-40 في السائل الدماغي الشوكي أكبر بـ 10 أضعاف من التراكيز المقابلة في المصل. واستنتج أن YKL-40 يفرز من البلاعم المفعلة داخل الجهاز العصبي المركزي [91] .

II- الدراسة العملية

1 – هدف الدراسة Study Aim

يتشارك في مرض السكري مجموعة من الاضطرابات الاستقلابية والآليات الالتهابية والمناعية التي تؤدي بدورها إلى مضاعفات متعددة. ولفهم هذه الآليات ومحاولة تجنب المضاعفات وتحسين الحالة الصحية والاجتماعية لهؤلاء المرضى، عمد الباحثون إلى تقصي ودراسة هذه العوامل، ومن العوامل الالتهابية التي تم اكتشافها حديثاً YKL-40. لذا هدف بحثنا إلى دراسة YKL-40 وبيان دوره عند مرضى السكري نمط2، وذلك من خلال:

- مقايسة المستويات المصلية للـ YKL-40 بطريقة الـ ELISA لدى مرضى الداء السكري نمط2 ومقارنتها بمجموعة الأصحاء.
- دراسة العلاقة بين YKL-40 ومجموعة من الواسمات الكيميائية الحيوية عند هؤلاء المرضى: منسب كتلة الجسم BMI ، المقاومة للأنسولين، الانترلوكين6 ،hsCRP وبعض المتثابتات الكيميائية الحيوية (الغلوكوز الدموي ، الهيموغلوبين السكري ، الكوليستيرول الكلي ، ثلاثيات الغليسريد ، البروتينات الشحمية منخفضة الكثافة LDL ، البروتينات الشحمية مرتفعة الكثافة HDL).

2- مجموعات الدراسة Study Groups

شملت دراستنا 82 فرداً موزعين إلى مجموعتين : المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى الداء السكري من النمط الثاني.

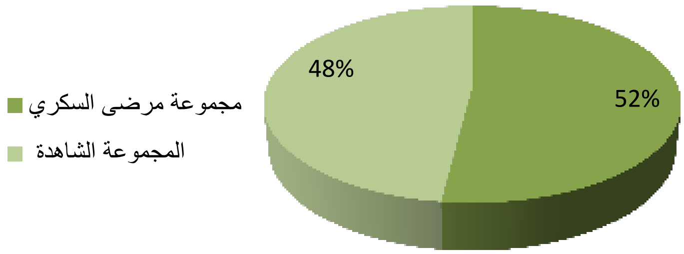
1-2 المجموعة الشاهدة

شملت أفراد أسوياء ظاهرياً عددهم 40 شخصاً (18 ذكور ، 22 إناث) لا يعانون من الداء السكري أو أية أمراض أخرى ولا يتناولون أي معالجة دوائية، متوسط أعمارهم 50 ± 10عاماً.

2-2 مجموعة مرضى الداء السكري من النمط الثاني

شملت مرضى مصابين بالداء السكري من النمط الثاني 42 شخص (24 ذكور ، 18 إناث) يتناولون أحد خافضات السكر الفموية على الأقل ، متوسط أعمارهم 53 ± 9 عاماً.

ويمثل الشكل(20) مخططاً لتوزع مجموعات الدراسة .



الشكل (20) توزع مجموعات الدراسة

3- الاعتيان Sampling

جرى جمع العينات في الفترة ما بين 2011/10/15 و 2012/2/20. حيث جُمعت العينات المرضية من مراجعي مراكز العيادات الشاملة التابع لوزارة الصحة ومن مستشفى المواساة، في حين جمعت عينات المجموعة الشاهدة من متطوعين أصحاء لا يراجعون أي مركز طبي.

أخذت عينات الدم (5 مل دم وريدي على أنبوب جاف و 1 مل دم وريدي على أنبوب حاوي على مضاد تخثر EDTA) على الريق بعد صيام حوالي 10 ساعات، في الفترة ما بين الثامنة والعاشرة صباحاً. نبذ الأنبوب الجاف مباشرة (3000 دورة في الدقيقة مدة 10 دقائق)، ووزع المصل الناتج على ثلاث أنابيب إيبندروف ، حفظت العينات في الدرجة -80مº إلى وقت إجراء المقايسات، حوالي ستة أشهر كحد أقصى. استخدمنا القسيمة الأولى لكل عينة لمقايسة الـ YKL-40 والقسيمة الثانية لمعايرة Insulin والـIL-6 والقسيمة الثالثة لمقايسة المتثابتات الكيميائية الحيوية الأخرى. في حين استخدم أنبوب الـ EDTA لمقايسة الهيموغلوبين السكري، حيث حفظ في البراد مدة من 2-7 أيام حتى وقت إجراء المقايسة. أجريت الاختبارات بطريقة ELISA على جهاز الـELISA الآلي في كلية الصيدلة بجامعة دمشق. وأجريت الاختبارات الكيميائية على جهاز نصف آلي في مختبر الدراسات العليا في كلية الصيدلة بجامعة دمشق.

3-1 استمارة الاستبيان

سجلت البيانات لأفراد الدراسة في بطاقات استبيان موضحة في الشكل21.

جامعة دمشق / كلية الصيدلة

بحث علمي لنيل شهادة الماجستير بعنوان

مقايسة كيميائية حيوية للواسم الالتهابي YKL-40 عند مرضى السكري نمط2

إعداد الصيدلاني عبدالقادر المالكي

إشراف : أ.د سحر الشماع

رقم المريض :

المستشفى او المركز : التاريخ : رقم الإضبارة :

اسم المريض : العمر: الجنس : الوضع العائلي :

عنوان المريض : المهنة : رقم الهاتف :

العادات : تدخين كحول

تاريخ الإصابة بالسكري :

القصة العائلية السكرية :

الطول : الوزن :

مشعر كتلة الجسم BMI :

درجة ضبط السكري : جيد ( ) وسط ( ) ضعيف ( )

المعالجات :

التحاليل المجراة :

TG: LDL: HDL: Insulin: TC:

hscrp: YKL-40 : IL-6: HbA1c: Glucose :

الشكل (21) استمارة الإستبيان

4- المواد والطرق المستخدمة

1-4 تعيين منسب كتلة الجسم BMI

عُين منسب كتلة الجسم لكل فرد من أفراد الدراسة بتقسيم وزن الجسم مقدراً بـ(كغ) على مربع الطول مقدراً بـالمتر .

$$BMI = \frac{\text{الوزن (كغ)}}{\text{مربع الطول (م)}}$$

2-4 مقايسة الـ YKL-40 بطريقة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA):

جرت المقايسة باستخدام عتيدة (Microvue YKL-40 ELISA kit) لشركة QUIDEL الأمريكية. وهي مصممة لقياس تركيز الـ YKL-40 البشري في المصل، البلازما والأوساط الزرعية النسيجية، وتعد هذه الطريقة الأكثر استخداماً في الدراسات العالمية .

1-2-4 مبدأ المقايسة :

تتألف هذه الطريقة من 3 خطوات. في الخطوة الأولى تضاف المحاليل المعيارية standards، محاليل الشاهد control ومحاليل العينات إلى آبار wells المعايرة المغطاة بالأفيدين مع محلول capture solution الحاوي على أجزاء مضافاً لها البيوتين F(ab) من الضد الفأري الوحيد النسيلة للـYKL-40. و يرتبط الضد الوحيد النسيلة إلى YKL-40 الموجود في محاليل كل من المعياري، الشاهد والعينة ويرتبط البيوتين بالستربتافيدين على microwell plate وبالتالي يمنع حركة الضد المرتبط به. وتجرى دورة غسل بعد فترة الحضن لإزالة أي مواد غير مرتبطة.

في الخطوة الثانية يضاف ضد YKL-40 أرنبي مقترن بالفسفاتاز القلوية Alkaline Phosphatase (AP) لكل بئر من الآبار السابقة. ثم يربط هذا الضد المقترن بالإنزيم إلى YKL-40 المحتجز من الخطوة الأولى. وبعد فترة الحضن تزيل دورة الغسل أي قرائن غير مرتبطة.

في الخطوة الثالثة تضاف لآبار المعايرة ركازة مولدة للون وهي p-nitrophenyl phosphate (pNPP). تتفاعل الفسفاتاز القلوية المرتبطة مع الركازة معطية لون أصفر. وبعد فترة الحضن يوقف التفاعل كيميائياً وتقاس الكثافة اللونية لمزيج التفاعل بالمقياس الضوئي الطيفي عند طول الموجة A405. إن كثافة اللون لمزيج التفاعل تكون متناسبة مع تراكيز YKL-40 الموجودة في كل من العينة، العياري والشاهد. تجمع النتائج من المنحني باستخدام linear regression analysis.

2-2-4 الكواشف و المواد الموجودة ضمن العتيدة

معياريات YKL-40: مرمزة بالرموز من A ← F

(A= 0 ng/ml) , (B=20 ng/ml) , (C=50 ng/ml) ,(D=100 ng/ml) , (E=200 ng/ml) ,(F=300ng/ml)

إضافة لشواهد عالية /منخفضة High/Low controls

وفيها الـYKL-40 مستحصل من خلايا osteosarcoma MG-63 في محلول دارئي مع مثبت stabilizer وآزيد الصوديوم (0.1%) كمادة حافظة.

- a- شرائط مغطاة coated strips: يدمص الستربتافيدين فيها على 96 بئر قابلة للكسر على مجموعات مؤلفة من 8 آبار محفوظة ضمن غلاف قابل للفتح وإعادة الإغلاق.
- b- محلول الايقاف stop solution: محلول 1/2 نظامي من ماءات الصوديوم NaOH.
- c- دارئة الغسل wash buffer X10: محلول منظف غير شاردي في محلول دارئة يحوي آزيد الصوديوم (0,05%) كمادة حافظة ويتم تمديده 10 مرات.
- d- دارئة الاستنشاء Reconstitution buffer: محلول منظف غير شاردي في دارئة، وآزيد الصوديوم (0,1%) كمادة حافظة.
- e- دارئة الركازة substrate buffer : محلول دي ايتانول أمين وكلوريد المغنزيوم يحوي آزيد الصوديوم (0,05%) كمادة حافظة.
- f- مضغوطات الركازة substrate tablets: بارا نترو فينيل فسفات.

g- الإنزيم المقترن Enzyme Conjugate : ضد YKl-40 أرنبي عديد النسيلة مجفد مقترن بالفسفاتاز القلوية يحوي دارئة ملحية ومثبتات.

h- محلول الالتقاط Capture solution: أضداد YKL-40 فأرية وحيدة النسيلة نمط Fab مقترنة بالبيوتين في محلول يحوي دارئة، وآزيد الصوديوم 0,1% كمادة حافظة.

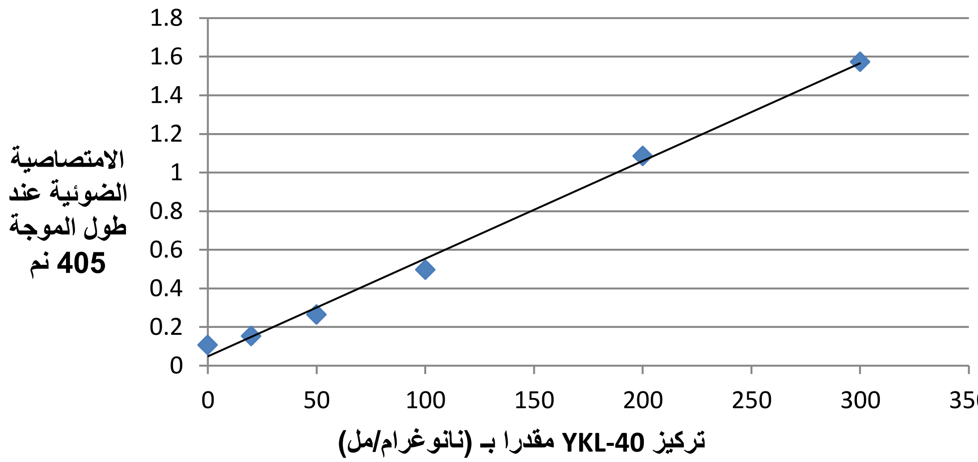
3-2-4 اجراءات وخطوات المقايسة

جرت المقايسة بعد برمجة خطوات العمل على جهاز ELISA الآلي كما يوضح الجدول7.

الجدول (7): ملخص إجراءات مقايسة YKL-40 بطريقة ELISA



ويبين الشكل (22) منحني الخط البياني الذي حصلنا عليه.



الشكل (22) : المنحنى المعياري الناتج عن معايرة YKL-40

4-3- مقايسة الهيموغلوبين السكري HbA1C

أجريت المعايرة باستخدام عتيدة من شركة Biosystems.

4-3-1- مبدأ الاختبار

بعد تحضير الحلالة الدموية وذلك بمزج الدم مع الكاشف الحال يتم فصل الهيموغلوبين السكري HbA1C عن باقي أشكال الهيموغلوبين الأخرى بواسطة راتين مبادل للهوابط ، وتحدد النسبة المئوية للهيموغلوبين السكري من الهيموغلوبين الكلي بقياس امتصاص الهيموغلوبين السكري والهيموغلوبين الكلي في موجة طولها 415 نانو متر.

4-3-2- الكواشف والعينات

- الكاشف رقم 1: يتألف من فتالات البوتاسيوم وعامل فعال على السطح و آزيد الصوديوم.
- الكاشف رقم 2 : دارئة فسفاتية
- الكاشف رقم 3 : دارئة فسفاتية
- العمود : يحتوي على كمية موزونة مسبقاً من راتنج مع دارئة فسفاتية.

4-3-3- طريقة العمل

أ- تحضير الحلالة الدموية Hemolysat

يضاف 50 مكرولتر من الدم الكامل إلى الكاشف رقم 1 ويمزج الأنبوب بشكل جيد، يترك المزيج لمدة 10 – 15 دقيقة، وبعدها سيتم استخدام الحلالة في معايرة الهيموغلوبين السكري والهيموغلوبين الكلي.

ب- فصل ومعايرة الهيموغلوبين السكري

- يؤخذ أنبوب الراتين ويمزج جيداً، ثم يضاف له 50 مكروليتر من الحلالة المحضرة مسبقاً.
- ننتظر حتى انتهاء الاستشراب ثم يضاف 200 مكرولتر من الكاشف رقم 2 .
- أيضاً ننتظر حتى انتهاء الاستشراب ونضيف بعد ذلك 2 مل من الكاشف رقم 2
- أيضاً بعد انتهاء الاستشراب ننقل أنبوب الراتنج إلى أنبوب أخر لجمع الخلاصة ونضيف بعدها 4 مل من الكاشف رقم 3 وننتظر حتى انتهاء الاستخلاص.
- نمزج جيداً ونقرأ امتصاص الهيموغلوبين السكري مباشرة ، يقرأ الامتصاص مقابل الماء المقطر في موجة طولها 415 نانومتر .

ت- معايرة الهيموغلوبين الكلي:

- نضع 4.8 مل من الكاشف رقم 3 ، ثم نضيف 200 مكرولتر من الحلالة المحضرة مسبقاً
- نمزج الأنبوب جيداً ، ثم نقرأ الامتصاص مقابل الماء المقطر بطول موجة 415 نانومتر.

ث- حساب الهيموغلوبين السكري

يتم حساب الهيموغلوبين السكري وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للهيموغلوبين السكري للعينة} = \frac{\text{قراءة امتصاص الهيموغلوبلين السكري} * \mathbf{100}}{\text{قراءة امتصاص الهيموغلوبين الكلي} * \mathbf{3}}$$

4-4 مقايسة الغلوكوز Glucose

استخدمنا الطريقة الإنزيمية (Glucose Oxidase Peroxidase) باستخدام عتيدة من شركة Biosystems. حيث يتم تعيين مستويات الغلوكوز في المصل بطريقة إنزيمية لونية وفقاً للمعادلات التالية :

$$Glucose + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} Gluconate + H_2O_2$$

$$H2O2 + Phenol + 4\text{-}Aminoantipyrine \xrightarrow{perioxidase} 4\text{-}(p\text{-}benzoquinone\text{-}mono\text{-}imino)\,phenazone + 4H_2O$$

حيث يؤكسد الغلوكوز بإنزيم الغلوكوز أكسيداز إلى غلوكونات وماء أكسجيني، وبوجود البيروكسيداز يتفاعل الفنول مع أمينو أنتي بيرين 4-AAP وذلك بوجود الماء الأكسجيني لتشكيل مركب ملون Quinoneimine ، تقاس شدة اللون الناتج بموجة طولها 500 نانومتر ، تتناسب شدة اللون الناتج مع تركيز الغلوكوز في العينة .

5-4 مقايسة ثلاثيات الغليسريد (Triglycerides)

1-5-4 المبدأ

اعتمدنا الطريقة الإنزيمية (Triglycerides GPO/PAP) باستخدام عتيدة من شركة Biosystems لمعايرة مستويات ثلاثيات الغليسريد في المصل، حيث جرى تعيين مستوياتها بطريقة إنزيمية لونية (Enzymatic colorimetric method) وفق التفاعلات المتسلسلة التالية:

$$Triglycerides + 3H_2O \xrightarrow{LPL} Glycerol + 3RCOOH$$

$$Glycerol + ATP \xrightarrow{Glycerolkinase} Glycerol\,3\text{-}phosphate + ADP$$

$$Glycerol\,3\,phosphate + O_2 \xrightarrow{GPO} Dihydroxyacetone + phosphate + H_2O_2$$

$$4\text{-}Aminophenazone + 2\,H_2O2 + ADPS \xrightarrow{POD} 2H_2O + HCl + Dye$$

(ADPS = N-Ethyle-N-(3-sulfoproyl)-3-menthoxyaniline)

(Dye = 4- (p_ benzoquinone- monoimino)- phenazone)

حيث تتحلمه ثلاثيات الغليسريد إلى غليسيرول وأحماض دهنية حرة بإنزيم الليبوبروتين ليباز. يتحول الغليسيرول بوجود الغليسيرول كيناز (GK) إلى غليسرول 3- فسفات والذي يتأكسد

بوساطة إنزيم Glycerol Phosphate Oxidase (GPO) ليعطي الماء الأكسجيني. إن التكاثف التأكسدي لـ ADPS و 4-أمينوفينازون بوجود البيروكسيداز والماء الأكسجيني يعطي صباغاً وردي اللون يقاس في موجة طولها 550 نم. تتناسب شدة اللون الناتج مباشرة مع تركيز ثلاثيات الغليسيريد في العينة.

6-4 مقايسة الكوليستيرول Cholesterol

استخدمنا طريقة إنزيمية لونية (Cholesterol CHOD/PAP) باستخدام عتيدة من شركة Biosystems وفق التفاعلات المتسلسلة التالية:

$$\text{Cholesterol esters} + 3H_2O \xrightarrow{\text{Chol-estrase}} \text{Cholesterol} + 3\text{R-COOH}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Chol-oxidase}} \text{4-Cholestenone} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4Aminophenazone} + \text{ADPS} \xrightarrow{\text{Peroxidse}} 4H_2O + \text{dye}$$

dye = 4- (p- benzoquinone- monoimino) – phenazone

حيث تتم حلمهة إسترات الكوليستيرول إلى كوليستيرول وأحماض دهنية حرة بوساطة إنزيم esterase، وبوجود الأكسجين وإنزيم oxidase يتحول الكوليستيرول إلى 4-Cholestenone والماء الأكسجيني. إن التكاثف التأكسدي لـ ADPS مع H2O2 بوجود إنزيم البيروكسيداز POD يؤدي إلى تشكل صباغ وردي، يقاس في موجة طولها 550 نم. تتناسب شدة اللون مباشرة مع تركيز الكوليستيرول في العينة.

7-4 مقايسة الكوليستيرول المنخفض الكثافة (LDL- Cholesterol)

استخدمنا الطريقة الترسيبية، حيث يترسب الـLDL بتأثير الفعل الترسيبي لكاشف الهيبارين على المصل. وتحوي الرشاحة بعد فصل الراسب على VLDL و HDL اللذان يحددان باستخدام كاشف الكوليستيرول الكلي بطريقة CHOD/PAP. تركيزالكوليستيرول في الـLDL يساوي الفرق بين الكوليستيرول الكلي والكوليستيرول في الرشاحة. أي:

LDL- Cholesterol = Total cholesterol - cholesterol concentration in the supernatant

8-4 مقايسة الكوليستيرول المرتفع الكثافة (HDL- Cholesterol) :

استخدمنا الطريقة الترسيبية (Precipitation Method)، حيث تترسب الكيلوميكرونات Chylomicrons و VLDL وLDL بشكل كمي بإضافة حمض الفسفوتنغستي وشوارد المغنيزيوم إلى العينة ويطفو HDL. بعد التثفيل يقاس تركيز الكوليستيرول في البروتين الشحمي المرتفع الكثافةHDL باستخدام طريقة (Cholesterol CHOD/PAP).

$$\text{HDL-Cholesterol esters} + 3H_2O \xrightarrow{\text{Chol-estrase}} \text{Cholestero} + \text{R-COOH}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Chol-oxidase}} \text{4- Cholestenone} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4Aminophenazone} + \text{ADPS} \xrightarrow{\text{Peroxidse}} 4H_2O + \text{dye}$$

dye = 4-(p- benzoquinone- monoimino)- phenazone

9-4 مقايسة الأنسولين بطريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA)

جرت المقايسة باستخدام عتيدة Insulin ELISA لشركة NovaTec الألمانية، وهي مصممة للتحديد الكمي لتراكيز الأنسولين البشري في المصل والبلازما، ومعدة للاستخدام في الدراسات التي تجرى في المختبر لأغراض تشخيصية.

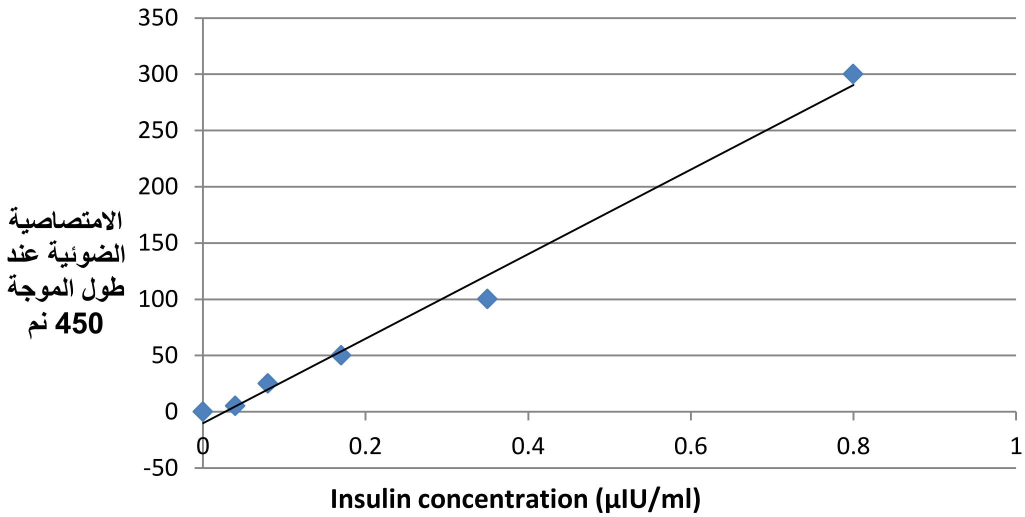
1-9-4 مبدأ المعايرة:

تعتمد هذه المقايسة على الربط المتزامن للأنسولين البشري مع نوعين من الأضداد وحيدة النسيلة. أحدهما مثبت على شرائح مكروية والآخر مقترن مع البيروكسيداز horseradish peroxidase (HRP). بعد الحضن، يجرى فصل الأضداد المرتبطة عن الحرة من خلال عملية غسل simple solid-phase washing، ثم يضاف محلول الركازة (TMP) (tetramethylbenzidine). ثم يوقف التفاعل اللوني بعد 15 دقيقة ويقاس الامتصاص. إن تراكيز الأنسولين في العينة تقاس استناداً إلى سلسلة من المعياريات. وتتناسب شدة اللون مع تركيز الأنسولين في العينة.

2-9-4 إجراءات المقايسة:

- يضاف 50 مكرولتر من العينات والمعياريات إلى آبارهم الخاصة.

- يضاف 100مكرولتر من محلول القرينة إلى كل بئر. ندع البئر A1 من أجل ناصع الركازة. تغطى الآبار بالرقاقة المرفقة مع العتيدة، ثم تُحضن لمدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة (22...28 مº)
- تفرغ محتويات الآبار عند انتهاء الحضن، ويغسل كل بئر 3مرات بـ 300 مكرولتر من محلول الغسل الممدد.
- يضاف 100 مكرولتر من محلول ركازة TMP في كل الآبار، ثم تُحضن لمدة 15 دقيقة في الظلام بدرجة حرارة 25مº.
- يُضاف 100مكرولتر من محلول الايقاف لكل الآبار بالترتيب ومعدل الإضافة نفسه محلول ركازة TMP. ويُقاس الامتصاص للعينات في موجة طولها 450 نم. ويبين الشكل 23 الخط البياني الذي حصلنا عليه .



الشكل (23) المنحنى البياني الناتج عن معايرة الأنسولين

4-9-5- القيم المرجعية

Children <12 yrs	____________	<10 µIU/ml
Adult (Normal)	____________	0.7 – 9.0 µIU/ml
Diabetic (Type II)	____________	0.7 – 25 µIU/ml

4-10 مقايسة البروتين المتفاعل C عالي الحساسية:

استخدمنا الطريقة العكرية المناعية من أجل تعيين كمية البروتين المتفاعل C في المصل والبلازما باستخدام عتيدة من شركة Human الألمانية.

- مبدأ وطريقة المقايسة

يتفاعل CRP البشري في عينة المريض والعياري و الشاهد مع أضداد الـCRP البشري anti-human CRP antibodies. تولد المعقدات المناعية المتشكلة عكراً turbidity متناسباً مع تراكيز CRP ويمكن قياسه بالمقياس الضوئي photometric. وتطرح العكرية الناتجة عن وجود الشحوم من خلال عامل تصفية الشحوم Lipid clearing factor LCF. وتحسب النتائج من خلال معياري الـCRP والذي يستخدم في كل سلسلة. وخطوات المقايسة ملخصة في الجدول 8.

الجدول 8: مراحل مقايسة CRP عالي الحساسية

	ناصع الكشف Rb	العينة	العياري
الماء	50مكرولتر	---	---
العينة/ المعياري	---	50 مكرولتر	50 مكرولتر
الدارئة	1000مكرولتر	1000مكرولتر	1000مكرولتر
نمزج بلطف ونحضن 5 دقائق بدرجة 37 م°. ثم تقاس الامتصاصية A1 لكل من الناصع والعينة أو المعياري			
ضد المصل AS	250مكرولتر	250مكرولتر	250مكرولتر
نمزج بلطف ونحضن 5دقائق بدرجة 37م°. ثم تقاس الامتصاصية A2 لكل من الناصع Rb والعينة أو المعياري			
الامتصاصية $\Delta A\ (Samble/STD) = (A2 - A1)(sample/STD)$ - $\Delta A\ Rb$			

ولحساب تراكيز CRP

$$C\ sample = Cstd \times \frac{\Delta A\ sample}{\Delta A\ std}\quad (mg/l)$$

4-11 مقايسة الـIL-6

وقد تم استخدام عتيدة Quantikine من شركة R&D systems الأمريكية من أجل تعيين تراكيز IL-6 البشري في الجزء الطافي من المزارع الخلوية وفي المصل والبلازما.

مبدأ وطريق المقايسة:

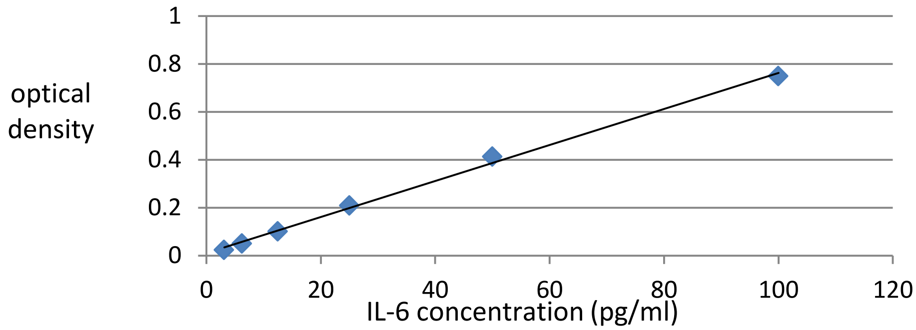
تستخدم هذه الطريقة تقنية sandwich ELISA الكمية . حيث تستخدم صفيحة مكروية Microplate مغطاة مسبقاً بضد وحيد النسيلة نوعي لـIL-6. توضع العينات والمعياريات في الآبار وكل الـIL-6 الموجود سوف يرتبط بالضد المثبت.

تجرى عملية غسل لإزالة أي مواد غير مرتبطة، ثم يضاف للآبار ضد متعدد النسيلة مقترن بإنزيم نوعي للـ IL-6. وبعد الغسل لإزالة أي كمية من معقد الضد- إنزيم غير مرتبطة، يضاف محلول الركازة للإنزيم السابق إلى الآبار ويتشكل لون تتناسب شدته مع كمية IL-6 الموجودة في العينة أو المعياري. يتم إيقاف زيادة تشكل اللون ومن ثم تُقاس الكثافة اللونية.

ويمكن تلخيص خطوات المعايرة بما يلي:

- تحضر كل الكواشف والمعياريات .
- يضاف 100 مكرولتر من ممدد المعايرة RA1W لكل بئر. ثم يضاف 100 مكرولتر من العياريات، العينة أو الشاهد إلى كل بئر. وحضن ساعتين في حرارة الغرفة.
- شفط ثم غسل 4 مرات. يضاف 200 مكرولتر من القرينة conjugate إلى كل بئر ثم حضن لمدة ساعتين بحرارة الغرفة. ثم شفط وغسل 4 مرات.
- يضاف 200 مكرولتر من محلول الركازة لكل بئر ويحضن 20 دقيقة بحرارة الغرفة.
- يضاف 50 مكرولتر من محلول الايقاف لكل بئر. يقرأ الامتصاص في موجة طولها 450 نم خلال 30 دقيقة.

ويبين الشكل (24) الخط البياني العياري الذي تم الحصول عليه في المعايرة.



الشكل(24) : المنحنى العياري الناتج عن معايرة IL-6

5- الدراسة الإحصائية Statistical study

جرى التعبير عن القيم المختلفة بحساب المتوسط الحسابي X و الانحراف المعياري SD، حسب العلاقات الإحصائية التالية:

$$\overline{X} = \frac{1}{n}(X1 + X2 + \ldots\ldots\ldots\ldots + Xn)$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n}\sum (x\,i - x)2}$$

اعتمد اختبار T student لتحديد فيما إذا كان الفارق بين المتوسطات ناجماً عن الحظ والمصادفة أم أنه فارق جوهري ذو دلالة إحصائية. وحسبت قيمة T تبعاً للعلاقة التالية:

$$\mu\,1 - \mu\,2 = |\ x\,1 - x\,2\ | \pm T\,\alpha/2\ \sqrt{S12\,/\,n1 + S22\,/\,n2}$$

اعتمد معامل ارتباط Pearson لدراسة قوة علاقة الارتباط، حيث تكون العلاقة قوية كلما اقتربت قيمة r من الواحد، تم حساب قيمة r حسب العلاقة :

$$r = \sum (x\,i - x).(y\ i - y)\,/\,n.\ Sx.Sy$$

اعتمدت قيمة $P < 0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً.

المصطلحات :

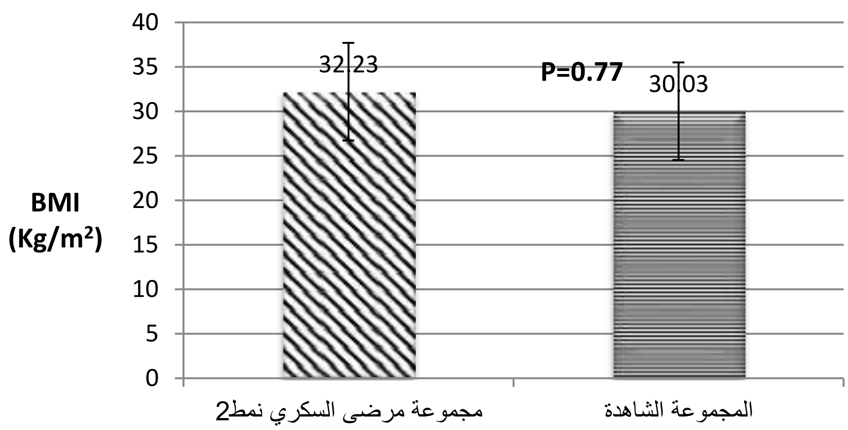
قيمة معامل الإرتباط r : الإنحراف المعياري للعينة , s : متوسط العينة, x : متوسط المجتمع, μ : الجذر التربيعي, V : حجم العينة, n

استخدم برنامج Microsoft office Excel 2007 ، و برنامج SPSS v19 لمعالجة البيانات وتحليلها ورسم المنحنيات البيانية.

6- النتائج Results

1-6 تعيين منسب كتلة الجسم (BMI)

بلغ متوسط منسب كتلة الجسم لدى المجموعة الشاهدة (40 فرداً) 30.03 كغ / م2 والانحراف المعياري 5.1 (30.03 كغ / م2 ± 5.1).في حين بلغ متوسط منسب كتلة الجسم لدى مجموعة مرضى السكري نمط2 (42 فرد) 32.23 كغ / م2 والانحراف المعياري 5.66 (32.23 كغ / م2 ±5.66) (الشكل25).



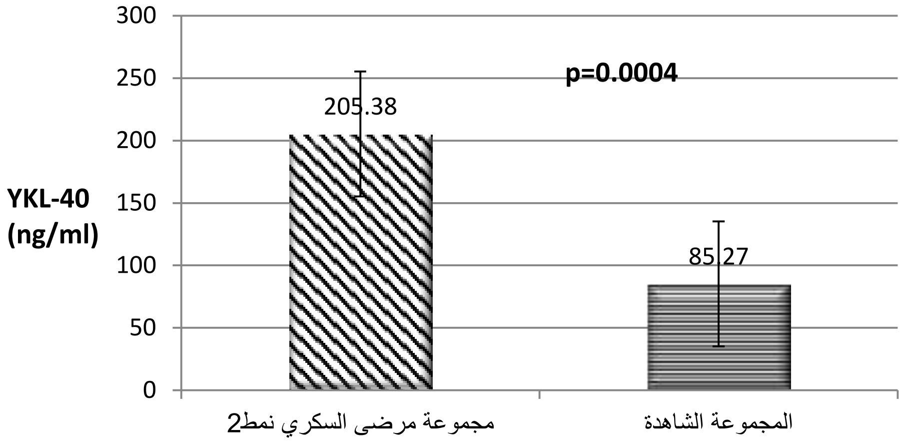
الشكل (25): متوسط منسب كتلة الجسم BMI لدى مجموعات الدراسة .

وبتطبيق اختبار T-Student لم يلاحظ فارق يعتد به إحصائياً (P=0.77) بين متوسط مستويات BMI لدى المجموعة الشاهدة ومتوسط مستويات BMI لدى مجموعة مرضى الداء السكري.

2-6 تعيين قيم YKL-40 المصل

كانت مستويات YKL-40 لدى المجموعة الشاهدة (40 فرداً) تتراوح بين 15.7- 256 نانوغرام/مل (المتوسط الحسابي 85.27 نانوغرام/مل والانحراف المعياري 50.53 نانوغرام/مل) ولدى مرضى الداء السكري (42 فرداً) تراوحت بين 43.9 - 432

نانوغرام/مل (المتوسط الحسابي 205.38 نانوغرام/مل والانحراف المعياري 110.22 نانوغرام/مل) (الشكل 26).

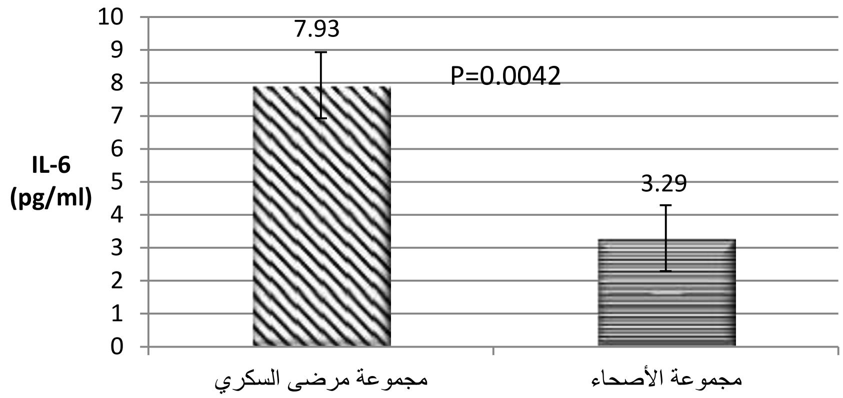


الشكل (26): متوسط تراكيز YKL-40 لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T-Student لوحظ فارق يعتد به إحصائيا (P=0.0004) بين متوسط مستويات YKL-40 لدى المجموعة الشاهدة ومتوسط مستويات YKL-40 لدى مجموعة مرضى الداء السكري نمط 2.

3-6 تعيين قيم IL-6 المصل

تراوحت القيم لدى المجموعة الشاهدة بين 1.2 – 4.7 بيكوغرام/مل (المتوسط الحسابي 3.29 بيكوغرام/مل والانحراف المعياري 0.9 بيكوغرام/مل)، و لدى مجموعة مرضى السكري نمط2 بين 5.4 – 9.3 بيكوغرام /مل (المتوسط الحسابي 7.93 بيكوغرام/مل والانحراف المعياري 1.14 بيكوغرام/مل) (الشكل 27) .

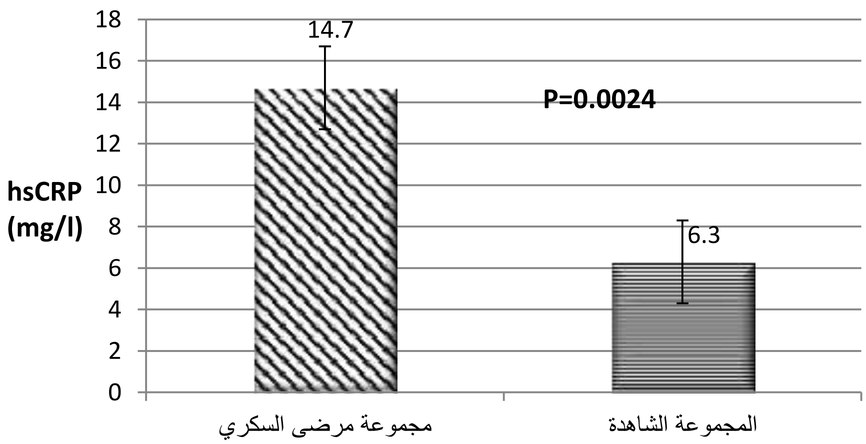


الشكل (27): متوسط تراكيز IL-6 لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً (P=0.0042) في متوسط مستويات IL-6 بين مجموعتي الدراسة.

4-5 تعيين قيم hsCRP المصل

تراوحت قيم hsCRP لدى المجموعة الشاهدة بين 0.35 و 11.2 (المتوسط الحسابي 6.3 والانحراف المعياري 3.0مغ/لتر). ولدى مجموعة مرضى السكري نمط2 تراوحت القيم بين 8.9 و 22.3 مغ/لتر (المتوسط الحسابي 14.7 مغ/لتر والانحراف المعياري 3.3مغ/لتر)، (الشكل 28).

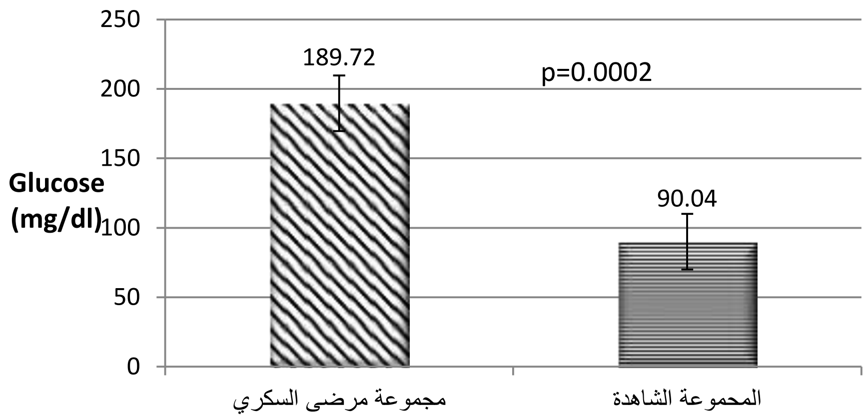


الشكل (28): متوسط تراكيز hsCRP لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً (P=0.0024) في متوسط مستويات hsCRP لدى مجموعتي الدراسة.

5-6 تعيين قيم الغلوكوز في المصل:

تراوحت القيم لدى المجموعة الشاهدة بين 70- 110 مغ/دل (المتوسط الحسابي 90.04مغ/دل والانحراف المعياري 9.2مغ/دل)، ولدى مجموعة المرضى بين 122- 375 مغ/دل (المتوسط الحسابي 189.72 مغ/دل والانحراف المعياري 69.19 مغ/دل) (الشكل 29).

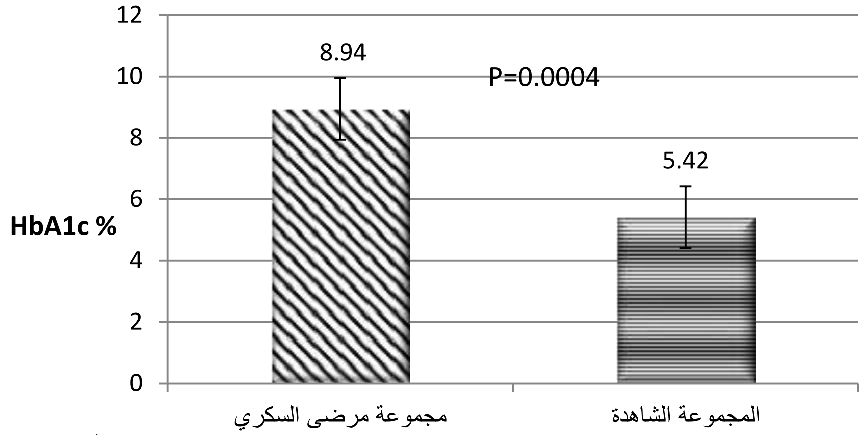


الشكل (29): متوسط تراكيز الغلوكوز لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً (P=0.0002) في متوسط مستويات الغلوكوز لدى مجموعة مرضى السكري و المجموعة الشاهدة.

6-6 تعيين قيم الهيموغلوبين السكري HbA1C

تراوحت قيم الهيموغلوبين السكري لدى المجموعة الشاهدة بين 3.9 – 6.4 %(المتوسط الحسابي 5.42 %والانحراف المعياري 0.71%) ، ولدى مجموعة مرضى السكري بين 5.8- 12% (المتوسط الحسابي 8.94 % والانحراف المعياري 1.9 %) (الشكل 30).

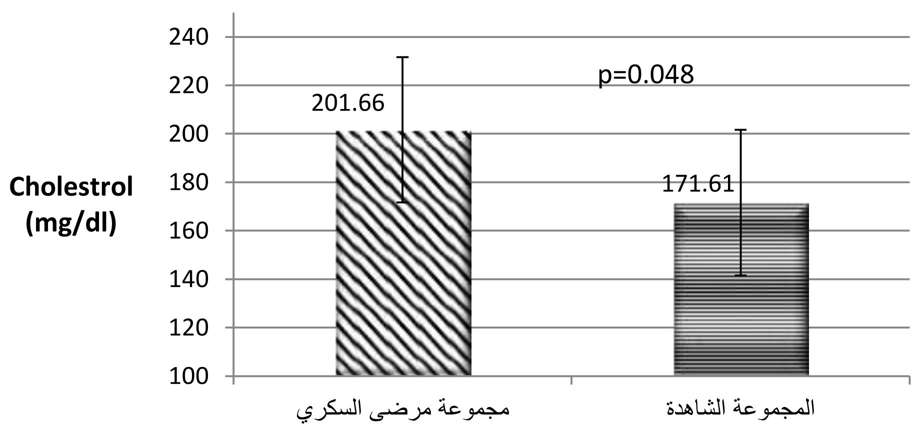


الشكل (30): متوسط تراكيز الهيموغلوبين السكري لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائيا (p=0.0004) في متوسط مستويات HbA1C لدى المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى السكري.

7-5 تعيين قيم الكوليستيرول في المصل

تراوحت قيم الكوليستيرول لدى المجموعة الشاهدة بين 98-222 مغ/دل (المتوسط الحسابي 171.61 مغ/دل والانحراف المعياري 28.74 مغ /دل) ، ولدى مجموعة مرضى السكري نمط2 بين 119- 323 مغ/دل (المتوسط الحسابي 201.66 مغ / دل والانحراف المعياري 38.53مغ /دل) (الشكل 31).

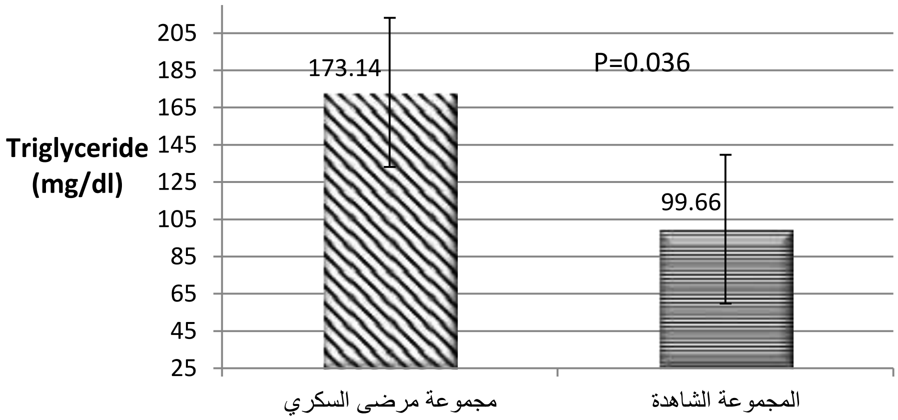


الشكل (31): متوسط تراكيز الكوليستيرول لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائيا (P = 0.048) بين متوسط مستويات الكوليستيرول لدى المجموعة الشاهدة ومتوسط مستويات الكوليستيرول لدى مجموعة مرضى السكري.

6-8 تعيين قيم ثلاثيات الغليسريد في المصل:

تراوحت قيم ثلاثيات الغليسيريد لدى المجموعة الشاهدة بين 61- 190 مغ /دل (المتوسط الحسابي 99.66 مغ/دل و الانحراف المعياري 43.74 مغ/دل)، ولدى مجموعة مرضى السكري بين 90 – 347 مغ/دل (المتوسط الحسابي 173.14 والانحراف المعياري 58.62 مغ /دل) (الشكل 32).

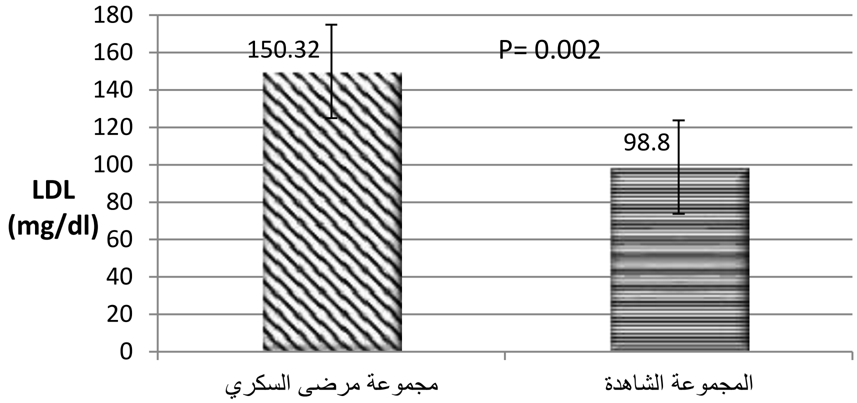


الشكل (32): متوسط تراكيز ثلاثيات الغليسيريد لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً (P= 0.036) بين متوسط مستويات ثلاثيات الغليسيريد لدى المجموعة الشاهدة ولدى مجموعة مرضى السكري .

6-9 تعيين قيم LDL المصلية

تراوحت قيم الـLDL لدى المجموعة الشاهدة بين 70 – 133 مغ/ دل (المتوسط الحسابي 98.8 مغ/دل والانحراف المعياري 15.89 مغ/دل)، ولدى مجموعة مرضى السكري بين 97-243 مغ/دل (المتوسط الحسابي 150.32 مغ/دل والانحراف المعياري 38.32 مغ/دل) (الشكل 33).

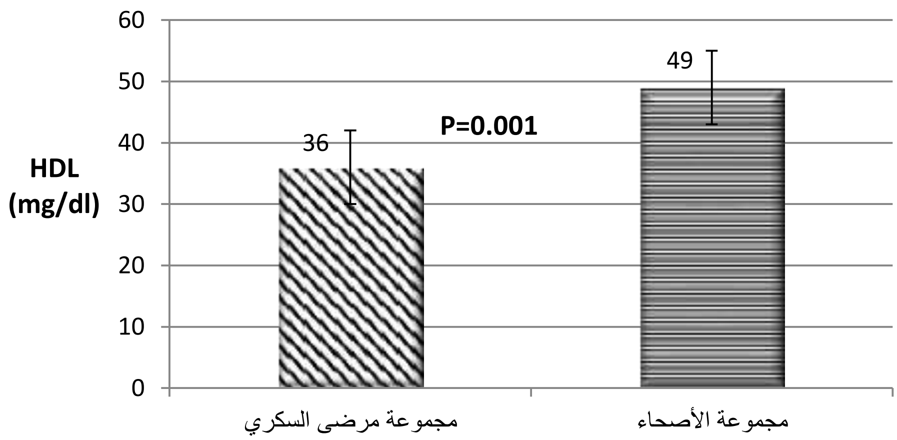


الشكل (33): متوسط تراكيز LDL لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائيا (P = 0.002) بين متوسط مستويات LDL لدى المجموعة الشاهدة ولدى مجموعة مرضى السكري.

10-6 تعيين قيم HDL المصلية

تراوحت القيم لدى المجموعة الشاهدة 40 - 64 مغ/دل (المتوسط الحسابي 49 مغ/دل والانحراف المعياري 6.2 مغ/دل)، ولدى مجموعة مرضى السكري بين 26 – 47 مغ/دل (المتوسط الحسابي 36 مغ/دل والانحراف المعياري 6.5 مغ/دل) (الشكل 34).

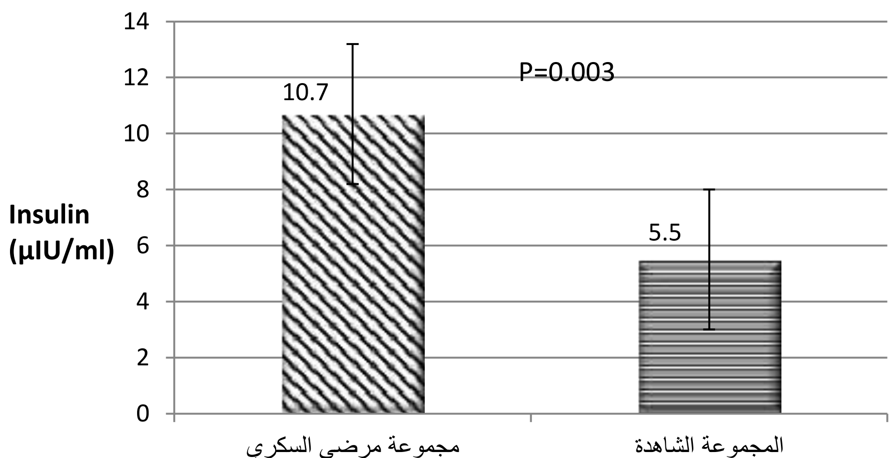


الشكل (34): متوسط تراكيز HDL لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً (p=0.001) بين متوسط مستويات HDL لدى المجموعة الشاهدة ومتوسط مستويات HDL لدى مجموعة مرضى السكري نمط2 .

11-6 تعيين قيم الأنسولين المصلية

تراوحت القيم لدى المجموعة الشاهدة بين3.1- 11.2 مكروحدة دولية/مل (المتوسط الحسابي 5.5 مكروحدة دولية/مل والانحراف المعياري 1.8 مكروحدة دولية/مل)، ولدى مجموعة مرضى السكري بين 5.3 – 19.1 مكروحدة دولية/مل (المتوسط الحسابي 10.7 مكروحدة دولية/مل والانحراف المعياري 3.4 مكروحدة دولية/مل). (الشكل 35).



الشكل (35): متوسط تراكيز الأنسولين لدى مجموعات الدراسة

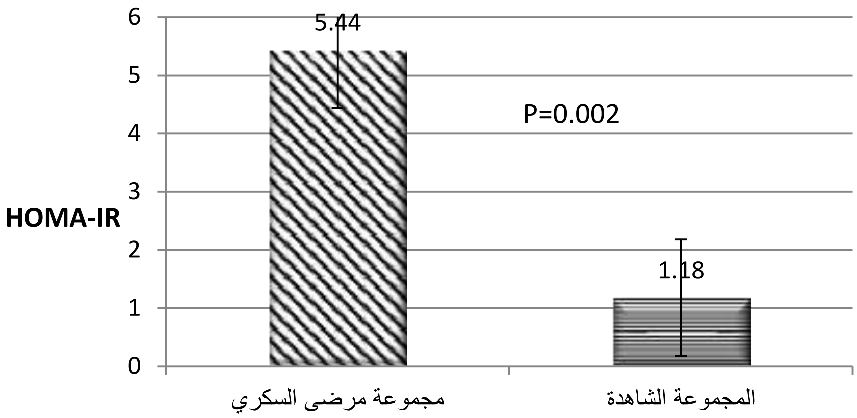
وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً ($p=0.003$) بين متوسط قيم الأنسولين لدى المجموعة الشاهدة ومتوسط قيم الأنسولين لدى مجموعة مرضى السكري نمط2.

12-6 تعيين قيم المقاومة على الأنسولين

جرى حساب قيم المقاومة على الأنسولين homeostasis model assessment index (HOMA-IR) باستخدام العلاقة :

$$HOMA-IR = \frac{Glucose(mg/dl) \times Insulin\ (\mu IU/ml)}{405}$$

تراوحت القيم لدى المجموعة الشاهدة بين 0.74- 2.98 (المتوسط الحسابي 1.18 والانحراف المعياري 0.26) ،ولدى مجموعة مرضى السكري بين 2.02- 8.21 (المتوسط الحسابي 5.44 والانحراف المعياري 2.92) (الشكل 36) .



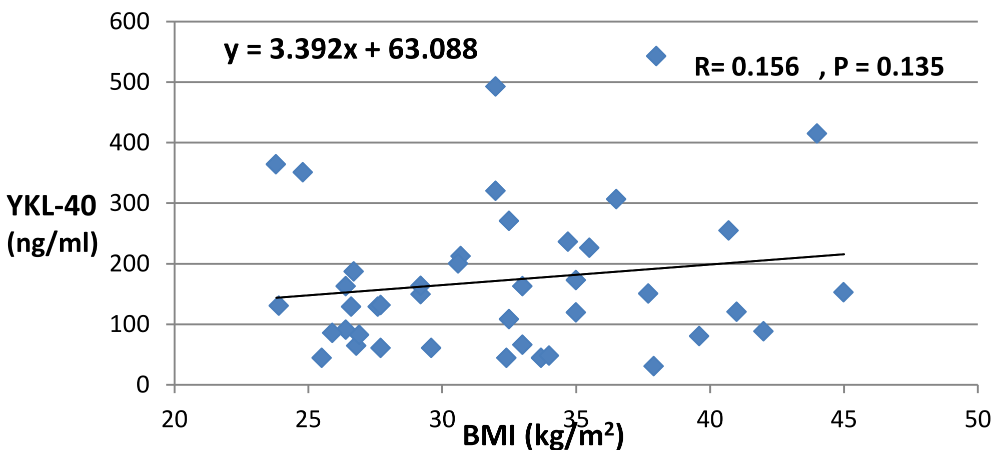
الشكل (36): متوسط قيم المقاومة على الأنسولين لدى مجموعات الدراسة

وبتطبيق اختبار T Student لوحظ فارق يعتد به إحصائياً (P=0.002)بين متوسط قيم المقاومة على الأنسولين لدى المجموعة الشاهدة ومتوسط قيم المقاومة على الأنسولين لدى مجموعة مرضى السكري نمط2.

6- 13 دراسة العلاقة بين مستويات الـ YKL-40 و المتثابتات المدروسة لدى مجموعة مرضى السكري نمط2 :

6-13-1- دراسة العلاقة بين YKL-40 ومنسب كتلة الجسم BMI :

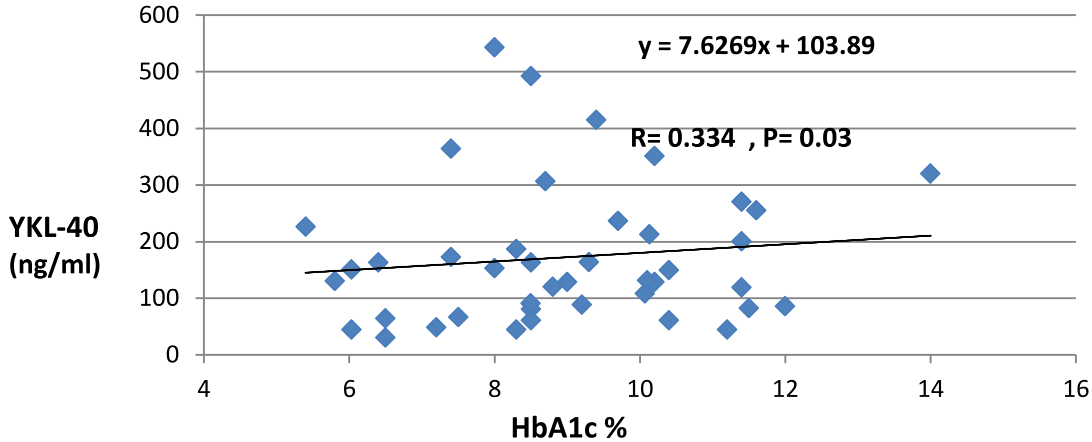
بدراسة العلاقة بين YKL-40 ومنسب كتلة الجسم لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية ولكن لا يعتد بها إحصائياً (P=0.135، R = 0.156) (الشكل 37).



الشكل (37) : علاقة الارتباط بين YKL-40 وBMI لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-2- دراسة العلاقة بين YKL-40 و الهيموغلوبين السكري HbA1C

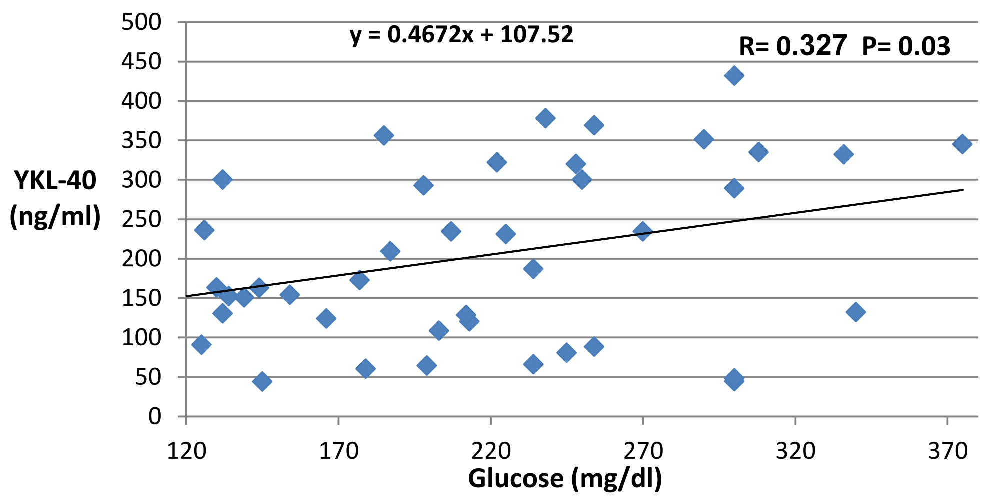
بدراسة العلاقة بين YKL-40 والهيموغلوبين السكري لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً (R= 0.334، p=0.03). (الشكل 38) .



الشكل (38):علاقة الارتباط بين YKL-40و الهيموغلوبين A1c لدى مجموعة مرضى السكري

6-13-3- دراسة العلاقة بين YKL-40 و الغلوكوز الدموي

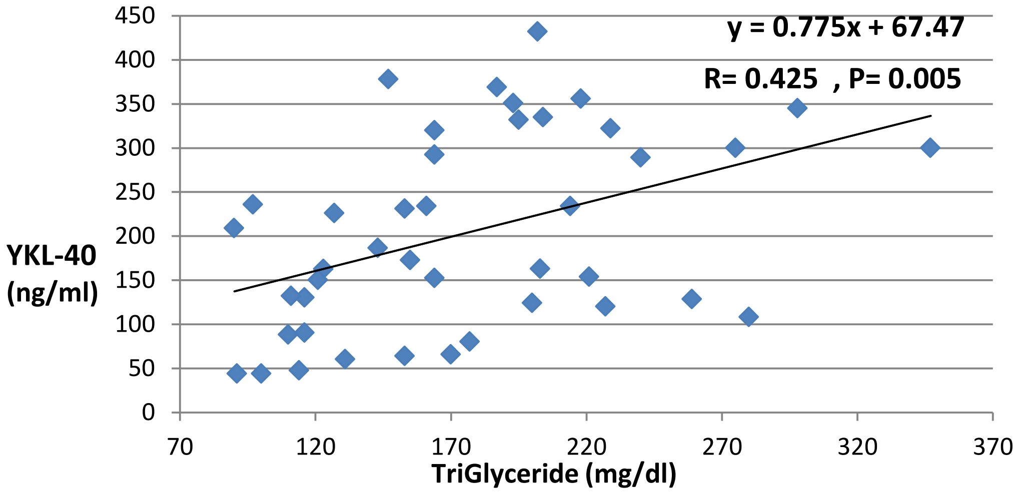
بدراسة العلاقة بين YKL-40 والغلوكوز لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً (P =0.03 ، R=0.327). (الشكل 39).



الشكل (39) : علاقة الارتباط بين YKL-40والغلوكوز لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-4- دراسة العلاقة بين YKL-40 و ثلاثيات الغليسيريد TGs

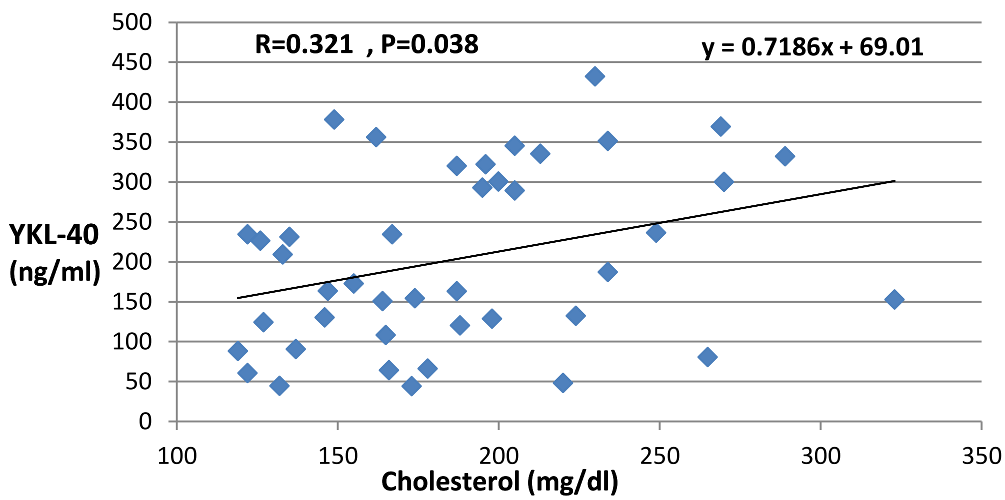
بدراسة العلاقة بين YKL-40 وثلاثيات الغليسيريد لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً (P= 0.005 , R= 0.425). (الشكل 40).



الشكل (40):علاقة الارتباط بين YKL-40 و TG لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-5- دراسة العلاقة بين YKL-40 و الكوليستيرول

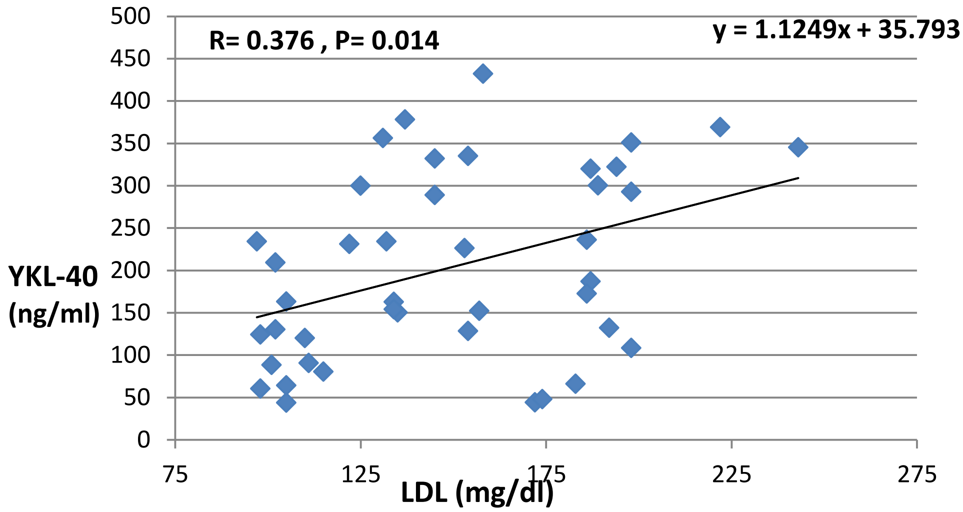
بدراسة العلاقة بين YKL-40 و الكوليستيرول لوحظ وجود علاقة ارتباط ايجابية يعتد بها إحصائياً (P=0.038 ، R=0.321). (الشكل 41).



الشكل (41):علاقة الارتباط بين YKL-40 والكوليستيرول لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-6- دراسة العلاقة بين YKL-40 و LDL

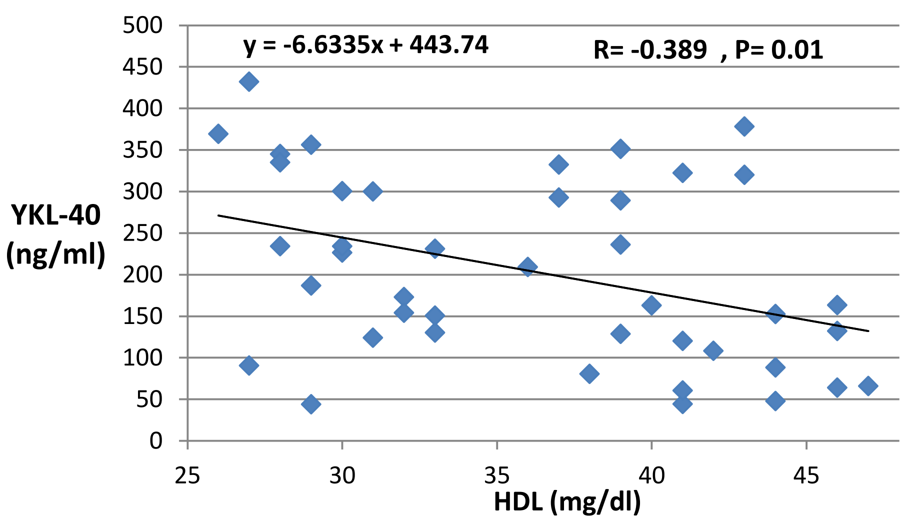
بدراسة العلاقة بين YKL-40 و LDL لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً (R= 0.376 , P= 0.014) (الشكل 42).



الشكل (42) علاقة الارتباط بين YKL-40 و LDL لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

7-13-6 دراسة العلاقة بين YKL-40 و HDL

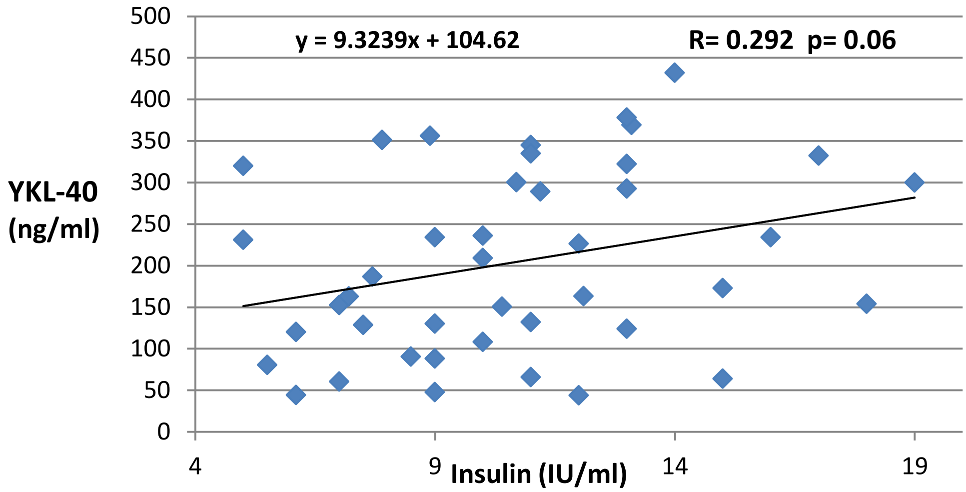
بدراسة العلاقة بين YKL-40 و HDL لوحظ وجود علاقة ارتباط عكسية يعتد بها إحصائيا (R=-0.389، P= 0.01) (الشكل 43).



الشكل(43) : علاقة الارتباط بين YKL-40 و HDL لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-8- دراسة العلاقة بين YKL-40 و الأنسولين :

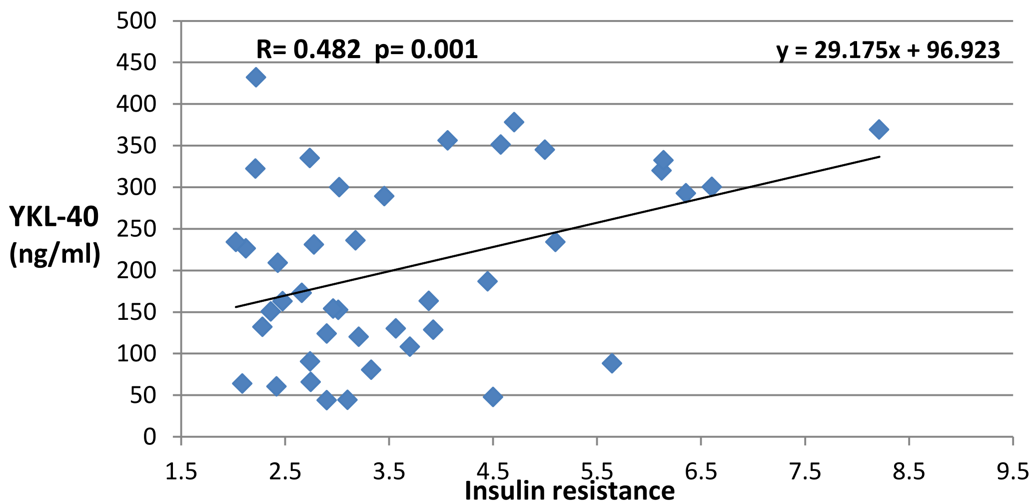
بدراسة العلاقة بين YKL-40 والأنسولين لوحظ وجود علاقة ارتباط ايجابية ولكن لا يعتد بها إحصائياً (P=0.06 ، R=0.292)(الشكل 44).



الشكل(44) : علاقة الارتباط بين YKL-40 و الأنسولين لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-9- دراسة العلاقة بين YKL-40 و المقاومة على الأنسولين

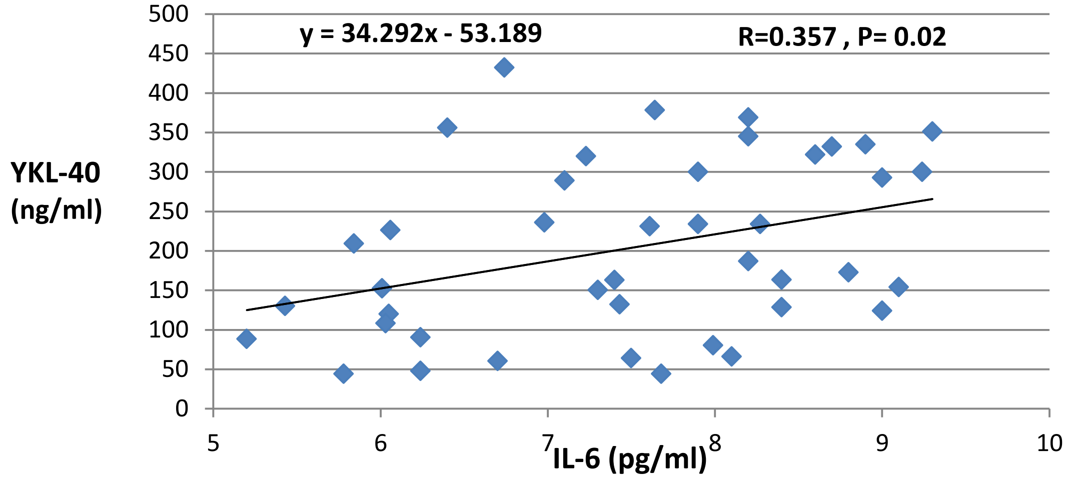
بدراسة العلاقة بين YKL-40 والمقاومة على الأنسولين لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً. (P= 0.001 , R=0.482) (الشكل 45).



الشكل(45) : علاقة الارتباط بين YKL-40 والمقاومة على الأنسولين لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-10- دراسة العلاقة بين YKL-40 والـ IL-6:

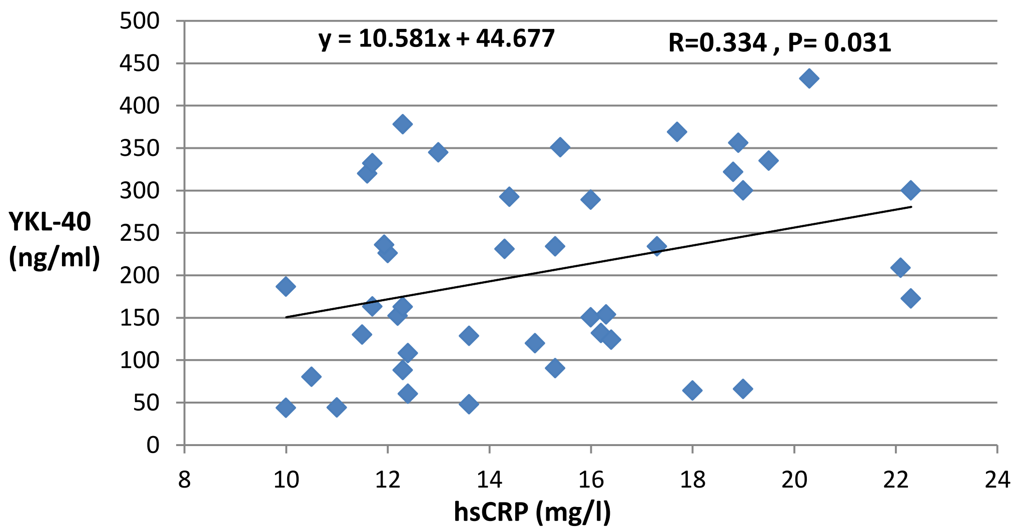
بدراسة العلاقة بين YKL-40 و العامل الالتهابي IL-6 لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً. (R=0.357 , P= 0.02) (الشكل 46).



الشكل(46) : علاقة الارتباط بين YKL-40 و IL-6 لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

6-13-11- دراسة العلاقة بين YKL-40 والـ hsCRP

بدراسة العلاقة بين YKL-40 و العامل الالتهابي hsCRP لوحظ وجود علاقة ارتباط إيجابية يعتد بها إحصائياً. (R=0.334 , P= 0.031) (الشكل 47).



الشكل (47): علاقة الارتباط بين YKL-40 و hsCRP لدى مجموعة مرضى السكري نمط2

7- المناقشة Discussion

1-7 YKL-40 لدى مرضى السكري نمط2

أظهرت دراستنا ارتفاعاً واضحاً يعتد به إحصائياً في مستويات YKL-40 لدى مرضى الداء السكري من النمط الثاني مقارنة مع أفراد المجموعة الشاهدة (p=0.0004). حيث كان متوسط قيم YKl-40± الانحراف المعياري لدى المجموعة الشاهدة 85.2± 50.5 نانوغرام/مل، ولدى مجموعة مرضى السكري نمط2 205.4 ± 110.2 نانوغرام/مل.

وهذا قد يُفسر بحدوث الالتهاب الجهازي تحت السريري لدى مرضى السكري نمط2، حيث لوحظ وجود ترافق بين العديد من الواسمات الالتهابية الجهازية مثل متفاعلات الطور الحاد مع معايير الداء السكري بما فيها المقاومة على الأنسولين.(73)

تؤدي الإصابة بالداء السكري إلى مجموعة من الاضطرابات الاستقلابية والأذيات الوعائية والتي تتفاقم عند عدم ضبط الغلوكوز الدموي، حيث تتعرض الخلايا وخاصة خلايا البطانة الوعائية إلى مستويات عالية من الغلوكوز لفترات طويلة، مما يؤدي إلى تدفق الغلوكوز إلى داخل هذه الخلايا. يؤدي تراكم الغلوكوز إلى نقص في إنتاج أكسيد النتريك وزيادة فعالية البروتين كينازC مما يؤدي إلى زيادة النفوذية الوعائية، حيث ترتشح بروتينات البلازما السكرية وتترسب على جدران الأوعية الشعرية وتحرض الخلايا البينية على تحرير عوامل النمو مثل TGF β الذي يحرض على الإنتاج المفرط للمكونات المطرسية خارج الخلوية، مما يؤدي إلى زيادة تحرير YKL-40. حيث بينت الدراسات وجود زيادة في التعبير عن YKL-40 والرنا المرسال الخاص به في خلايا البلاعم في أنسجة يحصل فيها إعادة تشكيل المطرس الخلوي matrix remodelling.[79,78,75,74,47,46]

كما تؤدي زيادة مستويات الغلوكوز إلى زيادة تفعيل سبيل البولي أولpolyol pathway الذي يؤدي إلى تحويل الغلوكوز إلى فركتوز، مما يزيد من تشكل النواتج النهائية للغلكزة المتقدمة AGEs. حيث تتراكم هذه المركبات مع تقدم العمر، وترتبط مع مستقبلات خاصة بها تدعى الـ RAGE موجودة على سطح الخلايا الالتهابية (مثل البلاعم والخلايا التائية)، مما يؤدي إلى تفعيلها. وتقوم هذه الخلايا وخاصة البلاعم المفعلة بإفراز عدد من السيتوكينات

والعوامل الالتهابية استجابة للحالة الالتهابية المزمنة التي يخلقها ارتفاع الغلوكوز. ويعد -YKl 40 أحد هذه العوامل المفرزة من البلاعم المفعلة، مما يؤدي إلى ارتفاع تراكيزه البلازمية لدى مرضى السكري مقارنة بالأصحاء.

توافقت هذه النتائج مع مجموعة من الدراسات العالمية التي أظهرت ارتفاع مستويات -YKL 40 عند مرضى السكري من النمط2 ومنها:

- دراسة Hyun K وزملاؤه(78) عام 2012 والتي أجريت في سيؤول بكوريا على 70 مريضاً بالداء السكري نمط 2.
- دراسة Lin وزملاؤه(79) عام 2012 والتي أجريت في تايوان على 628 مريضاً بالداء السكري نمط2.
- دراسة Persson وزملاؤه(72) عام 2012 والتي أجريت في كوبنهاغن في الدانمارك على 290 مريضاً بالداء السكري نمط2.
- دراسة Røndbjerg وزملاؤه (71)عام 2011 والتي اجريت في الدانمارك على 105 مرضى بالداء السكري نمط2 .
- دراسة F Hoellerl وزملاؤه(75) عام 2011 والتي أجريت في فيينا بالنمسا على 185 مريضاً بالداء السكري نمط2.
- دراسة Nielsen وزملاؤه(74) عام 2008 والتي أجريت في الدانمارك على 199 مريضاً بالداء السكري نمط2
- دراسة Rathcke وزملاؤه(73) عام 2006 والتي أجريت في الدانمارك على 87 مريضاً بالداء السكري نمط2 من العرق القوقازي.

2-7 دراسة الارتباط بين YKL-40 والواسمات الالتهابية hsCRP و IL-6:

لاحظنا وجود علاقة ايجابية يعتد بها إحصائياً مع IL-6 ‏(R=0.357 , P= 0.02) وكذلك مع البروتين الارتكاسي hsCRP ‏(R=0.334 , P= 0.03).

يدخل الالتهاب تحت السريري في إمراضية كل مراحل التصلب العصيدي لدى مرضى السكري نمط2. حيث أن الارتفاع الضئيل لكل من متفاعلات الطور الحاد، السيتوكينات ما قبل

الالتهابية proinflammatory وجزيئات الالتصاق الخلوي يكون مترافقاً بالتطور المستقبلي لاحتشاء العضلة القلبية، السكتة ومرض الأوعية المحيطي وكذلك مع زيادة الوفيات بالأمراض الوعائية.

ويفسر الترافق بين YKL-40 والواسمات الالتهابية بأن زيادة الـYKL-40 لدى مرضى الداء السكري نمط2 تسبب الاعتلال البطاني من خلال تحفيز الانجذاب الكيميائي chemotaxis، ربط وارتحال الخلية cell attachment and migration ، إعادة التنظيم وتبدل شكل النسيج كاستجابة للأذية البطانية. وإن YKL-40 يحرض هجرة خلايا العضلات الملساء الوعائية (vascular smooth muscle cells) VSMCs وتشكل النبيبات المتفرعة branching tubules مما يؤدي إلى زيادة إفراز عامل النخر الورمي TNFα من هذه الخلايا. يعتبر عامل النخر الورمي TNFα من السيتوكينات التي تعمل كطليعة التهابية متعددة الوظائف Multifunctional Proinflammatory Cytokine، حيث يعتبر من متفاعلات الطور الالتهابي الحاد ومسؤول عن إطلاق سيتوكينات إلتهابية أخرى مثل IL-6 وزيادة قابليتها للالتصاق على البطانة الوعائية ، كما يحفز تكاثر خلايا العضلات الملساء ضمن جدار الشريان الدموي(72).

من جهة أخرى، تزيد التراكيز المرتفعة من الغلوكوز وبشكل ملحوظ مستويات العديد من السيتوكينات ماقبل الالتهابية pro-inflammatory cytokines مثل IL-12 و IL-6 من قبل البلاعم macrophages. تقوم هذه السيتوكينات ببرمجة program أنواع محددة من الكريات البيضاء لتصبح خلايا تائية مساعدة T helper 1 (70). وبالتالي تحصل زيادة في الشدة الالتهابية والمناعية تقود إلى زيادة إفراز YKL-40 من البلاعم.

يعرف IL-6 بأنه سيتوكين غليكوزيلي متعدد الوظائف ينظم العديد من سمات ومظاهر العمليات الالتهابية. وهو ينتج من قبل أنواع عديدة من الخلايا كالخلايا اللمفاوية و البلاعم وحيدة الخلية والخلايا البطانية. يمتلك IL-6 تأثيراً منظماً لوظائف الخلايا التائية والبائية، وهو محفز قوي لبروتينات الطور الحاد (العامل المنبه للخلية الكبدية HSF)(70). وهذا ما قد يفسر الترافق

الإيجابي الواضح بين IL-6 وYKL-40. حيث أن كلاً منهما يفرز من البلاعم والخلايا البطانية استجابة لوجود الالتهاب لدى مرضى الداء السكري نمط2.

توافقت هذه النتيجة مع :

- دراسة Nielsen AR وزملاؤه (70) عام 2011 والتي أجريت في الدانمارك وبينت أن IL-6 يعمل على رفع التراكيز البلازمية لـYKL-40 عند الإنسان.
- دراسة Xing Z وزملاؤه (68) عام 1998 والتي بينت أن الـIL-6 يزيد من إفراز YKL-40 في الخلايا البشرية الغضروفية المعزولة حديثاً.

يعرّف البروتين المتفاعل hsCRP) C) بأنه بروتين بلازمي ترتفع تراكيزه في الدم استجابة للحالة الالتهابية، حيث يعد من بروتينات الطور الحاد. دوره الحيوي هو الارتباط بالفسفوكولين على سطح الخلايا الميتة بالجسم بهدف تفعيل المتممة من خلال المعقد C1Q. وتحصل استجابة الطور الحاد في عدد من الحالات مثل الانتانات الفطرية أو الجرثومية وفي الامراض الالتهابية والخباثات وحالات النخر النسيجية. وتعمل هذه الحالات على تحرير IL-6 وغيره من السيتوكينات من البلاعم والخلايا الشحمية وتسبب زيادة اصطناع CRP من الكبد.

ويفسر الترافق ما بين YKl-40 وhsCRP لدى مرضى السكري نمط2 بأنه مع تقدم المرض وعدم ضبط قيم الغلوكوز الدموي ضمن المجال الطبيعي، تزداد الشدة الالتهابية، ويعمل الغلوكوز المتراكم داخل الخلايا على إحداث مجموعة من الآليات تؤدي إلى إحداث تفعيل مزمن للخلايا الالتهابية والبلاعم، حيث تقوم الأخيرة بإفراز YKL-40 وعدد من السيتوكينات الالتهابية التي تحرض الكبد على إفراز hsCRP.

لم تتوافق هذه النتيجة مع دراسة Rathcke وزملاؤه**(73)** عام 2006 والتي أجريت في الدانمارك على 87 مريضاً بالداء السكري نمط2 . وقد يفسر هذا الاختلاف بكون المرضى في دراسة Rathcke حديثي الإصابة بالداء السكري. حيث أنه وفي المراحل المبكرة من الإصابة بالداء السكري تكون الحالة الالتهابية ضعيفة نتيجة عدم وجود ارتفاع مزمن للغلوكوز الدموي.

كما أن بالجدير الذكر أن YKl-40 وCRP يفرزان بآليتين مستقلتين عن بعضهما البعض فالـCRP هو معلم التهابي يفرز من الكبد بينما YKL-40 يفرز بشكل موضعي من البلاعم المفعلة.

7-3- دراسة الارتباط بين YKL-40 والواسمات الكيميائية الحيوية للداء السكري نمط2 المدروسة:

7-3-1- دراسة العلاقة بين YKL-40 و منسب كتلة الجسم BMI:

أظهرت دراستنا وجود ارتباط إيجابي ولكن لا يعتد به إحصائيا مع منسب كتلة الجسم BMI (P=0.135 , R=0.156).

وقد تفسر هذه النتيجة إلى أن YKL-40 لا يفرز من النسيج الشحمي، كما أنه لا يتم التعبير عن الرنا المرسال الخاص بـYKL-40 في النسيج الشحمي، وبالتالي البدانة لا تسبب مقاومة لفعل YKL-40، ولا تؤدي زيادة الكتلة الشحمية إلى زيادة إفراز YKL-40.

- وهذا يتوافق مع دراسة Nielsen وزملائه 2008 $_{(74)}$، والتي أجريت في الدانمارك على 199 مريضاً بالداء السكري نمط2 وبينت أن YKL-40 واسم للإصابة بالداء السكري نمط2 وغير مرتبط بالـBMI.

7-3-2- دراسة العلاقة بين YKL-40 و بين الغلوكوز والهيموغلوبين السكري

بينت دراستنا وجود ارتباط إيجابي يعتد به إحصائياً مع كل من الهيموغلوبين السكري (p=0.03، R= 0.334)، والغلوكوز الصيامي (P=0.03، R=0.327).

يعرف الهيموغلوبين السكري بأنه شكل من أشكال الهيموغلوبين يقاس بهدف معرفة معدل تراكيز الغلوكوز خلال فترة 3-4 أشهر. وهو يتشكل بطريقة لا إنزيمية نتيجة تعرض الهيموغلوبين إلى تراكيز مرتفعة من الغلوكوز. لذا فارتفاع تراكيز الغلوكوز المستمر يؤدي إلى ارتفاع قيم الهيموغلوبين السكري لدى مرضى السكري.

يفسر الارتباط بين قيم YKL-40 وبين كل من الغلوكوز الدموي والهيموغلوبين الغلوكوزي بأن تركيز الغلوكوز في الدم لدى هؤلاء المرضى يبقى مرتفعاً باستمرار، وهذه الزيادة تؤدي

إلى تأثيرات مخربة في الجهاز الوعائي. فجُدُر الشرايين تفقد مرونتها وتتوقف بطانتها عن إنتاج العوامل الحركية الوعائية (التي تؤدي إلى تقبُّض الأوعية وتوسعها) ومن بينها أكسيد النتريك NO. و تترافق هذه التبدلات مع زيادة عدد الخلايا العضلية الملساء في جدر الأوعية، وترسب الدهون في تلك الجدر، كما يزداد تحرير عوامل النمو growth factor، مما يؤدي إلى تبدلات في تركيب المطرس خارج الخلوي extracellular matrix وتفعيل الكريات البيضاء. تؤدي هذه التبدلات في تركيب المطرس الخلوي إلى زيادة إفراز YKL-40 وارتفاع تراكيزه البلازمية بالترافق مع زيادة الغلوكوز الدموي.

توافقت هذه النتائج مع مجموعة من الدراسات العالمية والتي بينت وجود علاقة ايجابية بين YKL-40 وبين كل من الغلوكوز و الهيموغلوبين الغلوكوزي، ومن بينها:

- دراسة Hyun وزملاؤه(78) عام 2012 والتي أجريت في سيؤول في كوريا على 70 مريض بالداء السكري نمط 2.
- دراسة Lin وزملاؤه(79) عام 2012 والتي أجريت في تايوان على 628 مريض بالداء السكري نمط2.
- دراسة Persson وزملاؤه(72) عام 2012 والتي أجريت في كوبنهاغن في الدانمارك على 290 مريض بالداء السكري نمط2.
- دراسة Røndbjerg وزملاؤه (71)عام 2011 والتي اجريت في الدانمارك على 105 مرضى بالداء السكري نمط2 .
- دراسة Hoellerl وزملاؤه(75) عام 2011 والتي أجريت في فيينا بالنمسا على 185 مريضاً بالداء السكري نمط2.
- دراسة Nielsen وزملاؤه(74) عام 2008 والتي أجريت في الدانمارك على 199 مريض بالداء السكري نمط2
- دراسة Rathcke وزملاؤه(73) عام 2006 والتي في الدانمارك أجريت على 87 مريض بالداء السكري نمط2 من العرق القوقازي.

3-3-7- دراسة العلاقة بين YKL-40 وبين الأنسولين والمقاومة على الأنسولين

بينت دراستنا وجود علاقة ارتباط ايجابية ولكن لايعتد بها إحصائياً مع تراكيز الأنسولين البلازمية (P=0.06 ، R=0.292) وعلاقة إيجابية يعتد بها إحصائياً مع المقاومة على الأنسولين (R=0.482, P= 0.001) لدى مرضى الداء السكري نمط2.

تؤدي المقاومة على الأنسولين إلى حدوث ارتفاع مزمن للغلوكوز الدموي الذي يؤدي بدوره إلى إفراز السيتوكينات ماقبل الالتهابية من قبل البلاعم المفعلة مثل IL-6 وTNF-α. كذلك بآلية معاكسة فإن الالتهاب يؤدي إلى المقاومة على الأنسولين من خلال بروتين Foxo-1 والذي يعمل على إفراز سيتوكينات التهابية مثل IL-1β ويتداخل في نقل إشارة الأنسولين مسبباً مقاومة لتأثير الأنسولين. في الحالة الطبيعية يثبط الأنسولين عمل foxo-1 وذلك بإخراجه من النواة ليتم تحطيمه في الهيولى. ولكن في حالة المقاومة على الأنسولين أو نقص الأنسولين فإن فعالية foxo-1 تزداد (92). ويفسر عدم وجود ارتباط واضح لـYKL-40 مع تراكيز الأنسولين إلى التبدلات اليومية التي تحصل في قيم الأنسولين تبعاً لتبدلات الغلوكوز البلازمي، وبالتالي لا تكون هذه القيم مرتبطة بشكل واضح بالحالة الالتهابية أو شدة الإصابة.

توافقت هذه النتائج مع مجموعة من الدراسات العالمية والتي أظهرت وجود علاقة إيجابية يعتد بها إحصائياً بين YKl-40 والمقاومة على الأنسولين. ومن بينها:

- دراسة Hyun K وزملاؤه(78) عام 2012 والتي أجريت في سيؤول في كوريا على 70 مريض بالداء السكري نمط 2.
- دراسة Persson وزملاؤه(72) عام 2012 والتي أجريت في كوبنهاغن في الدانمارك على 290 مريض بالداء السكري نمط2.
- دراسة Røndbjerg وزملاؤه (71)عام 2011 والتي أجريت في الدانمارك على 105 مرضى بالداء السكري نمط2 .
- دراسة Nielsen وزملاؤه(74) عام 2008 والتي أجريت في الدانمارك على 199 مريضاً بالداء السكري نمط2

- دراسة Rathcke وزملاؤه(73) عام 2006 والتي أجريت في الدانمارك على 87 مريضاً بالداء السكري نمط2 من العرق القوقازي.

7-3-4- دراسة العلاقة بين YKL-40 وبين الشحوم الدموية (TG,TC, LDL, HDL):

أظهرت دراستنا مايلي:

- وجود علاقة ارتباط ايجابية يعتد بها إحصائياً مع الكوليستيرول الكلي TC حيث كان معامل الارتباط (P=0.038 ، R=0.321).
- وجود علاقة ارتباط ايجابية يعتد بها إحصائياً مع البروتين الشحمي LDL حيث كان معامل الارتباط (R=0.376, P=0.014).
- وجود علاقة ارتباط ايجابية يعتد بها إحصائياً مع ثلاثيات الغليسيريد TG حيث كان معامل الارتباط (R= 0.425 , P= 0.005).
- وجود علاقة ارتباط عكسية يعتد بها إحصائياً مع البروتين الشحمي HDL حيث كان معامل الارتباط (P= 0.01 ،R=-0.389).

يفسر ذلك بأن فرط شحوم الدم (LDL-C↑، total cholesterol↑، Triglycerides↑، HDL-C↓) الذي يحدث عادةً لدى مرضى السكري وخاصة ارتفاع LDL وانخفاض HDL (الذي يقوم بحماية الخلايا من ترسبات LDL) يؤدي إلى إجهاد الخلايا المبطنة للشريان الدموي. حيث يترسب LDL في حال ارتفاع مستوياته تحت البطانة ويتعرض للأكسدة ليتحول إلى oxLDL. يعد هذا الاخير مستضداً غريباً وساماً للخلايا يستدعي رد الجهاز المناعي والالتهابي، حيث تتفعل البلاعم وتقوم ببلعمته فتتحول الى الخلايا الرغوية التي تتنخر وتتموت وتحرر إنزيماتها الحالة، التي تؤدي بدورها إلى تخرب الخلايا البطانية. ويعد YKL-40 أحد البروتينات الالتهابية التي تفرز من البلاعم المفعلة ومن الخلايا البطانية الملساء، مما يؤدي إلى ارتفاع مستوياته البلازمية بالترافق مع ارتفاع الـLDL كوليستيرول وشحوم الدم. توافقت هذه النتائج مع:

- دراسة Hyun K وزملاؤه(78) عام 2012 والتي أجريت في سيؤول في كوريا على 70 مريض بالداء السكري نمط 2.

- دراسة Rondbjerg وزملاؤه (71)عام 2011 والتي اجريت في الدانمارك على 105 مرضى بالداء السكري نمط2 .
- دراسة Rathcke وزملاؤه(73) عام 2006 والتي في الدانمارك أجريت على 87 مريض بالداء السكري نمط2 من العرق القوقازي.

حيث أظهرت هذه الدراسات وجود ارتباط إيجابي يعتد به إحصائياً بين YKL-40 وكل من TGو LDL وTC، وعلاقة عكسية يعتد بها إحصائياً مع HDL.

8- الاستنتاجات Conclusions

- ارتفاع مستويات الـYKL-40 لدى مرضى الداء السكري نمط2 مقارنة بالأصحاء.
- وجود ارتباط ايجابي واضح بين YKL-40 وبين كل من البروتين الإرتكاسي CRP والسيتوكين الالتهابي IL-6، مما يقترح وجود دور لـYKL-40 في تطور الحالة الالتهابية للأذية الوعائية.
- وجود ارتباط إيجابي واضح بين YKL-40 و كل من الغلوكوز، الهيموغلوبين السكري، المقاومة على الأنسولين.
- وجود ارتباط ايجابي واضح بين YKL-40 وبين الشحوم الدموية (TG, LDL, TC) وعلاقة عكسية مع HDL.

9- التوصيات والمقترحات Recommendations and Suggestion

سمحت لنا هذه الدراسة بفهم أعمق للآلية الإمراضية للأذية الوعائية عند مرضى السكري والتي بجوهرها تنتج عن عدم ضبط غلوكوز الدم عند هؤلاء المرضى بالتالي زيادة الشدة الالتهابية. لذلك فإنه اعتمادا على نتائج بحثنا نوصي بما يلي:

- مراقبة مستويات الـ YKL-40 عند مرضى الداء السكري نمط 2 كواسم التهابي مشارك في الأذيات الوعائية.
- مقايسة YKL-40 المصلي بالترافق مع مقايسة hsCRP وIL-6 عند مرضى السكري نمط2 كمشعر مبكر للأذيات الوعائية لدى هؤلاء المرضى.

❖ مقايسة ومراقبة المعالم الحيوية (LDL، HDL،TG، المقاومة على الأنسولين، الهيموغلوبين السكري) والتي تعد عوامل خطورة وعوامل مؤهبة لحدوث الأذيات الوعائية عند مرضى السكري نمط2، والعمل على ضبطها ضمن الحدود الطبيعية.

ونقترح مستقبلاً إجراء مايلي:

❖ دراسة تأثير الأدوية الخافضة لسكر الدم (السلفونيل يوريا و التيازوليدونات)على مستويات الـ YKL-40 لدى مرضى الداء السكري من النمط الثاني لمعرفة إمكانية اعتبار YKL-40 مشعراً لتحسن المرض بعد العلاج.

❖ دراسة تأثير الأدوية الخافضة للشحوم (الستاتينات) على مستويات YKL-40 لدى المرضى المصابين بارتفاع الشحوم.

❖ دراسة مستويات YKL-40 ومعرفة دوره وأهميته بالنسبة للأمراض السرطانية و داء الروماتيزم.

❖ دراسة احتمال وجود ترافق بين YKL-40 وبين البيلة الألبومينية لدى مرضى الفشل الكلوي لمعرفة إمكانية وجود دور لـYKL-40 في تطور الأذية الوعائية في الكلى ودراسة إمكانية اعتباره كواسم للدلالة على الفشل الكلوي .

:References المراجع

1- Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, and Loscalzo J. Diabetes Mellitus, Harrison's Internal Medicine 17th ed, Ed. Fauci A. and Kasper D. Pub McGraw-Hill (2008): 830-865.

2- Champe PC, Harvey RA, and Ferrier DR. Diabetes Mellitus , Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry 4th ed. Baltimore., Lippincott Williams & Wilkins (2007):623-647.

3- Tierney L M, McPhee S J ، Papadakis M A. Current medical diagnosis & treatment. International edition.New York:Lange Medical Books/McGraw-Hill (2008): 1203-1215.

4- U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011.

5- Brambilla P, La Valle E, Falbo R, Limonta G, Signorini S, Cappellini F, et al. Normal fasting plasma glucose and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(6):1372-1374.

6- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.Global prevalence of diabetes: estimates for 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27 (5): 1047–53.

7- Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. Diabetologia 46: 1297-1312, 2003.

8- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet* 2009;371:2153-2156.

9- Daly ME, Vale C, Walker M, Littlefield A, George K, Alberti M, Mathers J. Acute fuel selection in response to high-sucrose and high-starch meals in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(6):1516-1524

10- American Diabetes Association. Screening for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:11-14.

11- Harel PJ. Regulation of energy balance and carbohydrate/Lipid metabolism. Diabetes 2004; 53: 151.

12- John E. Gerich M. Classificaton And Diagnosis. *The Cadre Handbook of Diabetes Management*.2004;2:7-28.

13- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: 7, 2003.

14- Leese GP, Wang J, Broomhall J, et al. Frequency of severe hypoglycemia requiring emergency treatment in type 1 and type 2 diabetes: a population-based study of health service resource use. *Diabetes Care* 2003;26:1176-1180.

15- Risérus U, Willett WC, Hu FB . Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in Lipid Research*. 2009; 48 (1): 44–51.

16- Buchanan, T. A.; Xiang, A. H. "Gestational diabetes mellitus". *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115 (3): 485–491

17- Berger, H.; Crane, J.; Farine, D.; Armson, A.; De La Ronde, S.; Keenan-Lindsay, L.; Leduc, L.; Reid, G. et al. "Screening for gestational diabetes mellitus". *Journal of obstetrics and gynaecology Canada 2002;* 24 (11): 894–912.

18- Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011;57(6):793-798.

19- "Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia" . World Health Organization. 2006.

20- Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, et al. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2006;29(12):2739-2748.

21- [Guideline] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care* 2012;35 (1):11-63.

22- Srinubabu G, Allam A, Narasimha R. Identification of Biomarkers for Type 2 Diabetes And Its Complications: A Bioinformatic Approach. *InternatIonal journal of BIomedIcal science*. 2007;3:229-236.

23- Stephen C, Eric H, Karen L , Sookja C. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *Journal of the American Society of Nephrology*.2003;14:233-236.

24- Michael B, Aiello M,Cooper A,Vinik R, Nesto A. Complications of Diabetes Mellitus . *Kronenberg: Williams Textbook of Endocrinology*.2008;32: 1417-1478.

25 -Angelika B, Marion A, Reinhard Z, Peter P. AGEs And Their Interaction With AGE-receptors in Vascular Disease and Diabetes Mellitus. *The AGE Concept. Cardiovascular Researc*h.1998;37:586-600.

26- vinay K,Abul K,Nelson F,Jon A. Kumar: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. *pathogenesis of the complications of diabetes*.2009;8.

27- Michael B. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying mechanis.*Diabetes*.2004;54:1615-1625.

28- Class C,and Wilztum J . Atherosclerosis : The road ahead . *Cell*. 2002; 104: 503-516.

29- Nakashima Y, Raincs EW, plump AS, Breslowj I,and Rossr A. Upregulation of VCAM-1 and I CAM-1 Athersclerosis – prone sites on the endothelium in the APO – deficient mouse *. Arterio Scler thromb Vase Biol*.2005; 18: 841-842.

30- Hansson G and Libby P.The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* .2006; 6(7): 508–519.

31- Hareyan A. The Pathway Linking High Glucose to Inflammation That Can Cause Diabetes Complications. *eMaxHealth*. 2006.

32- Packard R, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *The American Association for Clinical Chemistry*. 2008

33- Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherothrombosis: from population biology and bench research to clinical practice. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:33-46.

34- Hoofnagle M.H, Thomas J.A, B. R. Wamhoff B.R, and Owens G.K. Origin of neointimal smooth muscle: we've come full circle Arteriosclerosis ,*Thrombosis, and Vascular Biology* .2006; 26 (12): 2579–2581.

35- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 1993; 329: (14) 977–986.

36- Johansen, J.S.; Cintin, C.; Jørgensen, M.; Kamby, C.; Price, P.A. Serum YKL-40: a new potential marker of prognosis and location of metastases of patients with recurrent breast cancer. *Eur. J. Cancer* 1995; *31A*: 1437–1442.

37- Hakala BE, White C, Recklies AD: Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1993; 268:25803-25810.

38- Hauschka PV, Mann KG, Price P, Termine JD: Report of the Ad Hoc Committee on Nomenclature and Standards for Bone Proteins and Growth Factors. *J Bone Miner Res* 1986; 1: 485-486.

39- Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hrebicek M, Aerts JM: Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998; 251:504-509.

40- Tsai, M.L., Liaw, S.H., Chang, N.C. The crystal structure of Ym1 at 1.31 A resolution. J. *Struct. Biol*2004; 148, 290-296.

41- Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JMFG, van Aalten DMF. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. J Biol Chem 2002;277:25537-44.

42- Henrissat, B.; Davies, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 1997; *7*: 637–644.

43- Houston, D.R.; Recklies, A.D.; Krupa, J.C.; van Aalten, D.M.F. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 2003; *278*: 30206–30212.

44 - Rehli, M.; Niller, H.H.; Ammon C.; Langmann, S.; Schwarzfischer, L.; Andreesen, R.; Krause S.W. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 2003; *278*: 44058–44067.

45 -Rehli, M.; Krause, S.W.; Andreesen, R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* 1997; *43*: 221–225.

46- Johansen JS, Christensen IJ, Riisbro R, Greenall M, Han C, Price PA, Smith K, Brünner N, Harris AL. High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival. *Breast Cancer Res Treatment* 2003;80:15-21.

47- Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sørensen S, Nielsen HJ. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer* 2002;95:267-74.

48 - Ringsholt, M.; Høgdall, E.V.S.; Johansen, J.S.; Price, P.A.; Christensen, L.H. YKL-40 protein expression in normal human tissues - an immunohistochemical study. *J. Mol. Histol.* 2007; *38*: 33–43.

49- Johansen, J.S.; Høyer, P.E.; Larsen, L.A.; Price, P.A; Møllgård, K. YKL-40 protein expression in the early developing human musculoskeletal system. *J. Histochem. Cytochem.* 2007; *55*: 1213–1228.

50- Stig E Bojesen; Julia S Johansen; Børge G Nordestgaard Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 2011;412(9-10):709-712.

51 - Schmidt, H.; Johansen, J.S.; Sjoegren, P.; Christensen, I.J.; Sørensen, B.S.; Fode, K.; Larsen, J.; von der Maase, H. Serum YKL-40 predicts relapse-free and overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer stage I and II melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2006; *24*: 798–804.

52 - Johansen, J.S.; Lottenburger, T.; Nielsen, H.J.; Jensen, J.E.B.; Svendsen, M.N.; Kollerup, G.; Christensen, I.B. Diurnal, weekly, and long-time variation in serum concentrations of YKL-40 in healthy subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; *1:* 2603–2608.

53 - Fredriksson, S.; Horecka, J.; Brustugun, O.T.; Schlingemann, J.; Koong, A.C.; Tibshirani, R.; Davis, R.W. Multiplexed proximity ligation assays to profile putative plasma biomarkers relevant to pancreatic and ovarian cancer. *Clin. Chem.* 2008, *54*, 582–589.

54 - Cintin C, Johansen JS, Skov F, Price PA, Nielsen HJ. Accumulation of the neutrophil-derived protein YKL-40 during storage of various blood components. *Inflammation Res* 2001;50:107-11.

55 - De Ceuninck F, Gaufillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureau P. YKL-40 (Cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:926-31.

56- Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 2002;365:119-26.

57 - Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J* 2004;380:651-9.

58 - Malinda KM, Ponce L, Kleinman HK, Shackelton LM, Millis AJT. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res* 1999;250: 168-73.

59 - Nishikawa KC, Millis AJT. Gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 2003;287:79-87.

60 - Shackelton LM, Mann DM, Millis AJT. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem* 1995;270:130-163.

61 - Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 2000; 404:725-728.

62 -Boot RG, Blommaart EFC, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts JMFG. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* 2001;276:607-643.

63 - Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hrebicek M, Aerts JMFG. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998;251:504-509.

64 - Houston DR, Recklies AD, Krupa JC, van Aalten DMF. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003;278:213-228.

65 -Laurent TC. The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. *Wenner-Gren International Series*. 2001;72:

66 - Stokes DG, Liu G, Coimbra IB, Piera-Velazquez S, Crowl RM, Jimenez SA. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum* 2002;46: 404-19.

67 - Johansen JS, Olee T, Price PA, Hashimoto S, Ochs RL, Lotz M. Regulation of YKL-40 production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:826-37.

68 -Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X-F, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-20.

69 - Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis. If T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. Review. *Arthritis Rheum* 2003;48:594-601.

70- Nielsen AR, Plomgaard P, Krabbe KS, Johansen JS, Pedersen BK: IL-6, but not TNF-α, increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine* 2011.

71- Røndbjerg A, Omerovic E, Vestergaard H. YKL-40 levels are independently associated with albuminuria in type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2011; 10:54

72- Persson F, Rathcke C, Gall M, Parving H, vestergaard H, Rossing P. High YKL-40 levels predict mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2012; 84-89

73- Rathcke CN, Johansen JS, Vestergaard H: YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Inflamm Res* 2006; 55:53-59.

74- Nielsen AR, Erikstrup C, Johansen JS, Fischer CP, Plomgaard P, Krogh-Madsen R, Taudorf S, Lindegaard B, Pedersen BK: Plasma YKL-40: a BMI-independent marker of type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57:3078-3082.

75- Hoellerl F, Brix J, Koppensteiner R, Schernthaner G and Schernthaner G : YKL-40, a marker of plaque rupture, is elevated in type 2 diabetic patients with early stages of nephropathy defined by albuminuria and related to micro- and macrovascular. *Oxford journals* 2011

76- Hempen M, Kopp HP, Elhenicky M, Hobaus C, Brix JM, Koppensteiner R, Schernthaner G, Schernthaner GH: YKL-40 is Elevated in Morbidly Obese Patients and Declines After Weight Loss. *Obes Surg* 2009; 19(11):1557-63.

77- Schaller G, Brix JM, Platcher-sorko G. YKL-40 concentrations are not elevated in gestational diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*. 2010; 40(4)

78- Hyun K, Byung L, Young S, Won K, Hyuk-C. Potential association between coronary artery disease and the inflammatory biomarker YKL-40 in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*. 2012

79- Lin C, Li H, Jiang Y, Chang T, Chuang L. Plasma YKL-40 Predicts 10-Year Cardiovascular and All-cause Mortality in ndividuals with Type 2 Diabetes. *Clinical Endocrinology*. 2012

80- Kucur M, Isman FK, Karadag B, Vural VA, Tavsanoglu S: Serum YKL- 40 levels in patients with coronary artery disease. Coron Artery Dis 2007, 18:391-396.

81- Boot RG, van Achterberg TA, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM, de Vries CJ: Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:687-694.

82- Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquie YP, Hefta SA, Opiteck GJ: In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:1200-1210.

83- Wang Y, Ripa RS, Johansen JS, Gabrielsen A, Steinbruchel DA, Friis T, Bindslev L, Haack-Sorensen M, Jorgensen E, Kastrup J: YKL-40 a new biomarker in patients with acute coronary syndrome or stable coronary artery disease. *Scand Cardiovasc J* 2008; 42:295-302.

84- Kastrup J, Johansen JS, Winkel P, Hansen JF, Hildebrandt P, Jensen GB, Jespersen CM, Kjoller E, Kolmos HJ, Lind I, Nielsen H, Gluud C: High serum YKL-40 concentration is associated with cardiovascular and all-cause mortality in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2009; 30:1066-1072.

85- Marott SC, Benn M, Johansen JS, Jensen GB, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. YKL-40 levels and atrial fibrillation in the general population. *Int J Cardiol*. 2012; 21:225-253

86- Kjaergaard AD, Bojesen SE, Johansen JS, Nordestgaard BG: Elevated plasma YKL-40 levels and ischemic stroke in the general population. *Ann Neurol* 2010;68:672-80.

87- Johansen JS: Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006; 53:172-209.

88- Shao R, Hamel K, Petersen L, Cao QJ, Arenas RB, Bigelow C, Bentley B, Yan W: YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene* 2009; in press.

89- Nicolai A. Schultz and Julia S. Johansen: YKL-40—A Protein in the Field of Translational Medicine: A Role as a Biomarker in Cancer Patients? Cancers 2010; 2(3): 1453-1491.

90- Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. Rheumatology 1999;38:618–26.

91- Vestergaard, C.; Johansen, J.S.; Benfield, T.; Price, P.A.; Lundgren, J.D. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin. Diagn. Lab. Immun*. 2002; 9: 598–604.

92- Kamagate A, Dong H. FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production. *Cell Cycle*. 2008; 7(20): 3162–3170.